

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE, DO PH E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO MTA, DO CIMENTO PORTLAND PURO E DO
CIMENTO PORTLAND ADICIONADO DE AGENTES
RADIOPACIFICADORES.**

Aracaju

Fevereiro/2016

MARTA JUDITE NUNES LIMA

**AVALIAÇÃO DA RADIOPACIDADE, DO PH E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DO MTA, DO CIMENTO PORTLAND PURO E DO
CIMENTO PORTLAND ADICIONADO DE AGENTES
RADIOPACIFICADORES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) como pré-requisito para Defesa do Mestrado Acadêmico em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Mitsunari Takeshita.

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior.

Aracaju

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Lima, Marta Judite Nunes

L732a Avaliação da radiopacidade, do pH e da atividade antimicrobiana do MTA, do cimento Portland puro e do cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores / Marta Judite Nunes Lima; orientador Wilton Mitsunari Takeshita. – Aracaju, 2016.

97 f. : il.

Dissertação (mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Radiografia. 2. Materiais biomédicos. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. 4. Materiais dentários. 5. Dentes - Radiografia. I. Takeshita, Wilton Mitsunari, orient. II. Título.

CDU 616.314:615.849



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de fevereiro de 20016, considerou a candidata Marta Judite Nunes Lima aprovada.

1. Prof. Dr. Wlton Mitsunari Takeshita
2. Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Batista de Melo
3. Prof. Dr. Luís Roque Araújo dos Santos

“Tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier
a ter e ser, vem de Ti e te dedico, Senhor!”

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus, pela força e proteção! Tu és o meu tesouro, minha herança, meu supremo bem! Muitíssimo obrigada por devolver a vida da minha mãe... Não tenho palavras para agradecer Tua bondade, dia após dia me cercas com fidelidade... Por me colocar no colo e carregar em Seus braços quando não tenho mais forças para prosseguir... Por permanecer ao meu lado, me abraçar e segurar as minhas mãos, quando posso andar... Tu és meu TUDO!
- ✓ A Jesus Cristo, meu Mestre, Caminho, Verdade e Vida!
- ✓ Ao Divino Espírito Santo, pela iluminação, força, paz, sabedoria e consolações a cada instante!
- ✓ Aos meus pais, por tudo de bom e bem que me proporcionam! Vocês são as jóias mais preciosas que Deus me presenteou! Tudo de mais valioso que possuo na Terra! Só Ele é capaz de mensurar como é grande o meu amor por vocês!
- ✓ A Tia Elzira pelos cuidados constantes com minha mãe e com todos nós! A senhora é uma “santa” que Deus colocou em nossas vidas e na vida de todos que te cercam! Só Ele pode te recompensar, querida!
- ✓ Aos meus familiares, por se alegrarem comigo por mais esta vitória concedida pelo Senhor!
- ✓ Ao meu orientador, Professor Dr. Wilton Mitsunari Takeshita, pela ética, respeito, dignidade, compreensão, tolerância e paciência diante dos meus questionamentos, dificuldades e limitações! Pela boa-vontade em me ajudar durante as grandes lutas que tenho atravessado... Que o Senhor Deus Todo-Poderoso abençoe e proteja a sua família!
- ✓ Ao meu co-orientador e amigo Professor Dr. Antônio Márcio Barbosa Júnior, pelo apoio e solicitude em disponibilizar o laboratório para o desempenho desta pesquisa!
- ✓ A professora Dra. Maria de Fátima Batista de Melo pelo apoio no estágio docência!
- ✓ A Andemilson, pelo imprescindível auxílio nos procedimentos laboratoriais!
- ✓ A todos que intercedem por mim e, direta ou indiretamente, me ajudam a atravessar as lutas e desertos da vida e contribuíram para essa conquista! Que Deus possa recompensá-los.

RESUMO

Introdução: A radiopacidade é uma propriedade obrigatória em todos os materiais odontológicos. Esta característica permite este material seja distinguido das superfícies dentárias através da radiografia. O cimento Portland (CP) apresenta propriedades físicoquímicas e biológicas semelhantes ao Agregado Trióxido Mineral (MTA), exceto pela partícula radiopacificadora. **Objetivo:** Avaliar a radiopacidade, atividade antimicrobiana e pH do MTA, CP puro e CP adicionado de diferentes radiopacificadores. **Materiais e Métodos:** Foi analisada a radiopacidade do MTA, CP e CP adicionado dos radiopacificadores: iodofórmio, óxido de chumbo, óxido de zircônio, subnitrato de bismuto, sulfato de bário e óxido de bismuto nas proporções 15%, 20% e 30%. A radiopacidade foi avaliada por meio do sistema de radiografia digital semi-direto (Instrumentarium Kavo EXPRESS®). O CP e os cimentos selecionados com radiopacidade adequada (ANSI/ADA nº 57) foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana e do pH. A atividade antimicrobiana foi analisada pelos testes de microdiluição e difusão em ágar. O micro-organismo testado foi o *Enterococcus faecalis*, sendo uma cepa padrão (ATCC 29212) e seis cepas clínicas (LMA 26, LMA 27, LMA 28, LMA 29, LMA 31 e LMA 34). O pH foi aferido com pHmetro digital (pH Meter Pocket-sized). Os testes estatísticos utilizados foram os testes Shapiro-Wilk de normalidade, análise de variância ANOVA e Tukey a nível de significância de 5%. **Resultados:** O CP puro apresentou o menor valor de radiopacidade, O MTA, CP + iodofórmio 20% (3,59 mmEq.Al), CP + óxido de bismuto 20% (4,79 mmEq.Al), CP + subnitrato de bismuto 20% (3,12 mmEq.Al), CP + óxido de chumbo 20% (3,18 mmEq.Al) e CP + óxido de zircônio 30% (4,28 mmEq.Al). No teste de difusão em ágar, a cepa LMA 26 foi inibida pelo CP, CP + Iodofórmio 20%, CP + Óxido de Zircônio 30%, CP + Subnitrato de Bismuto 20% e CP + Óxido de Bismuto 20%. A cepa LMA 31 foi inibida pelas associações CP + óxido de zircônio 30% e CP + subnitrato de bismuto 20% e a cepa LMA 27 foi inibida pelo CP + subnitrato de bismuto 20%. As demais cepas não foram inibidas. No teste de microdiluição, a maioria das cepas foi inibida pelos materiais-testes, exceto a cepa ATCC 29212 que não foi inibida pelo CP + óxido de chumbo 20%, as cepas LMA 28, 29, 31 e 34 não foram inibidas pelas associações CP + óxido de chumbo 20% e CP + óxido de zircônio 30%, sendo que as cepas LMA 28 e 29 também não foram inibidas pelo CP + óxido de bismuto 20%. Todos os cimentos testados apresentaram alcalinidade em todos os períodos experimentais, sendo que o MTA apresentou os menores valores de pH. **Conclusões:** O MTA e as concentrações de CP adicionado de 20% do agente radiopacificador subnitrato de

bismuto e CP adicionado do agente radiopacificador iodofórmio, 20% em peso, proporcionaram radiopacidade satisfatória, alcalinizaram o meio e promoveram atividades bactericida e bacteriostática contra as cepas de *E. faecalis* testadas.

Palavras-chaves: Radiografia digital; Materiais biocompatíveis; pH; Testes de sensibilidade microbiana.

ABSTRACT

Introduction: The radiopacity is a required property in all dental materials. This characteristic allows this materials be able to be distinguished from the tooth surfaces through the radiography. Portland cement (PC) presents physico-chemical and biological properties similar to mineral trioxide aggregate (MTA), except for radiopacifier. **Objective:** To evaluate the radiopacity, antimicrobial activity and pH of the MTA, pure PC and PC added different radiopacifiers. **Materials and Methods:** The radiopacity of MTA, pure PC and PC added the radiopacifying: iodoform, lead oxide, zirconium oxide, bismuth subnitrate, barium sulfate and bismuth oxide in the proportions 15%, 20% and 30% were analyzed. The radiopacity was carried out using a semi-direct digital radiography system (Instrumentarium Kavo EXPRESS®). The PC and cements selected with adequate radiopacity (ANSI/ADA No. 57) were evaluated for their antimicrobial activity and pH. Antimicrobial activity was analyzed by microdilution tests and agar diffusion. The microorganism tested were *Enterococcus faecalis*, as a standard strain (ATCC 29212) and six clinical strains (LMA 26, LMA 27, LMA 28, LMA 29, LMA 31 and LMA 34). The pH was measured using a digital pH meter (pH Meter Pocket-sized). Statistical analyzes were performed using the Shapiro-Wilk normality test, ANOVA and Tukey with significance level of 5%. **Results:** Pure PC had the lowest radiopacity. The MTA, PC + iodoform 20% (3.59 mmEq.Al), PC + bismuth oxide 20% (4.79 mmEq.Al), PC + bismuth subnitrate 20% (3.12 mmEq.Al), PC + 20% lead oxide (3.18 mmEq.Al) and PC + 30% zirconium oxide (4.28 mmEq.Al). Regarding the agar diffusion test, the LMA 26 strain was inhibited by PC, PC + Iodoform 20%, PC + 30% Zirconium Oxide, PC + Bismuth subnitrate 20%, and PC + Bismuth Oxide 20%. The LMA 31 strain was inhibited by PC + zirconium oxide 30% and PC + bismuth subnitrate 20% and LMA 27 strain was inhibited by PC + bismuth subnitrate 20%. The other strains were not inhibited. In the microdilution test, most strains was inhibited by tested materials, except the ATCC 29212 strain which was not inhibited by PC + lead oxide 20%. LMA 28 29, 31 and 34 strains were not inhibited by PC + lead oxide 20% and PC + zirconium oxide 30%, in which LMA 28 and 29 strains were not inhibited by PC + bismuth oxide 20%. All cements tested showed alkalinity in all experimental periods, in which MTA had the lowest pH. **Conclusions:** MTA and PC added the radiopacifiers subnitrate bismuth and iodoform in concentrations of 20% by weight, provided satisfactory radiopacity, alkaline medium and promoted bactericidal and bacteriostatic activities against strains of *E. faecalis* tested.

Key words: Digital radiography; Biocompatible materials; pH; Microbial susceptibility testing.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Objetivos	14
3. Metodologia	15
3.1. Análise de radiopacidade	16
3.1.1. Confeção e montagem das amostras	16
3.1.2. Radiografia das amostras	17
3.1.3. Leitura da radiopacidade	17
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana	18
3.2.1. Obtenção das linhagens de micro-organismos	19
3.2.2. Revitalização das linhagens testes	20
3.2.3. Teste de microdiluição	21
3.2.4. Teste de difusão em ágar	27
3.3. Análise do pH	29
3.4. Análise estatística	30
4. Resultados	31
5. Considerações finais	66
6. Comunicado de imprensa (<i>PRESS RELEASE</i>)	67
Referências	68
Anexo A – Normas da Revista Dental Materials	76

1. INTRODUÇÃO

A radiopacidade dos materiais restauradores é de extrema importância para a interpretação radiográfica. Esta característica permite ao clínico observar nas radiografias a adaptação das restaurações nas superfícies dentárias, determinando a existência de excesso ou falta de material restaurador (Bouschlicher *et al.*, 1999). A radiopacidade é aceita como uma propriedade obrigatória em todos os materiais odontológicos. Dentre eles, os materiais protéticos, cimentos endodônticos, agentes cimentantes, resinas compostas diretas e indiretas entre outros (Takeshita *et al.*, 2004).

Desde a confirmação das excelentes propriedades físicas e biológicas do agregado de trióxido mineral, também conhecido comercialmente com MTA, o seu uso tem sido difundido na Odontologia (Lee *et al.*, 1993; Torabinejad & Chivian, 1999). O MTA é um cimento endodôntico reparador, que, baseando-se em evidências científicas e em estudos clínicos, é indicado para o tratamento de acidentes e complicações endodônticas, tais como capeamento pulpar, reparação das perfurações e reabsorção radicular, apicificação e cirurgia oral (Parirokh & Torabinejad, 2010; Torabinejad & Parirokh, 2010, Souza *et al.*, 2015).

Semelhante ao MTA, o Cimento Portland (CP) veio revolucionar o tratamento endodôntico, substituindo o formocresol, que apresenta alta toxicidade, e o MTA, que é de alto custo (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2014). O CP é um material usado na construção civil (Bosso-Martelo *et al.*, 2016), constituído por silicatos de cálcio, alumínio, ferro, fases de clínquer e outros compostos e é biologicamente compatível com os tecidos dentários (Martínez-Lalis *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2011).

O CP apresenta composição química semelhante ao MTA, exceto pela partícula radiopacificadora (Asgary *et al.*, 2009; Bidar *et al.*, 2007). Tem sido proposto como um material alternativo para obturação retrógrada do canal radicular (Valera *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2006), em substituição ao MTA, uma vez que suas propriedades físicas são também semelhantes (Islam *et al.*, 2006). Inúmeras pesquisas *in vitro* e *in vivo* (Camilleri *et al.*, 2005; Bodanezi *et al.*, 2009; Holland *et al.*, 2001) surgiram diante da possibilidade de se estender os benefícios desse material, de custo significativamente menor, a uma parcela maior da população que necessita de tratamentos endodônticos complexos (da Silva *et al.*, 2015).

No entanto, o CP é menos radiopaco do que o MTA (ADA, 1977), limitando a sua visualização radiográfica após a inserção no canal radicular (Tanomaru-Filho *et al.*, 2007). Em condições de uso clínico, a baixa radiopacidade desse cimento dificulta a distinção das estruturas anatômicas adjacentes, como dentina e osso (Leites *et al.*, 2008, Costa *et al.*, 2014, Bosso-Martelo *et al.*, 2016, Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2014).

A fim de resolver este problema, agentes radiopacificadores que são normalmente utilizados em materiais dentários têm sido propostos para serem agregados (Hungaro Duarte *et al.*, 2012, Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2012, Chen *et al.*, 2014, Mestieri *et al.*, 2014). O resultado é de importância clínica, pois interessa não só ao radiologista, mas, especialmente, ao clínico, que poderá distingui-las entre si, de outros materiais, estruturas dentárias, lesões de cárie e outras alterações (Ergücü *et al.*, 2010).

A radiopacidade satisfatória possibilita o diagnóstico correto de cáries primárias ou secundárias, de excessos de material restaurador sobre as margens cervicais de superfícies proximais, o contorno proximal de restaurações, bem como o contato com o dente adjacente e a distinção entre material forrador ou restaurador de espaços vazios e fendas (ADA, 1981; Akerboom *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 1990). A especificação nº 57 da ANSI/ADA (2000) recomenda que um material endodôntico apresente radiopacidade mínima de 3.00 mmEq.Al (ADA, 2000).

Além da radiopacidade, a atividade antimicrobiana e pH alcalino são características imprescindíveis nos materiais obturadores (Bosso-Martelo *et al.*, 2016). As infecções endodônticas persistentes, resultantes da resistência bacteriana às substâncias utilizadas no tratamento endodôntico, mostram a necessidade da pesquisa de novas moléculas antimicrobianas a partir de outras fontes, seja natural ou sintética. (Rocha *et al.*, 2013).

Em amostras coletadas durante o tratamento endodôntico, em casos de resposta insuficiente ou retratamento de canais obturados com insucesso, bactérias entéricas anaeróbias facultativas podem ser identificadas nos canais radiculares (Pinheiro *et al.*, 2003, da Silva *et al.*, 2011). A contaminação bacteriana dos canais radiculares resulta em interação inflamação periapical, afetando negativamente uma nova formação óssea periapical e, conseqüentemente, a cura dessas lesões (da Silva *et al.*, 2011).

O *Enterococcus faecalis* é o micro-organismo mais comumente isolado de dentes com infecções pós-tratamento endodôntico, afetados por lesões periapicais persistentes (Islam *et al.*,

2006; Paradella *et al.*, 2007; Nacif & Alves, 2010; da Silva *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2013). É uma bactéria gram positiva, anaeróbia facultativa, normalmente encontrada no trato gastrintestinal dos seres humanos e outros mamíferos (Alves *et al.*, 2015).

A habilidade de formação de biofilme pelo gênero *Enterococcus* permite a colonização de superfícies inertes e biológicas, protege contra agentes antimicrobianos e ação de fagócitos, mediando adesão e invasão de células do hospedeiro (da Silva *et al.*, 2011). A hidrólise de colágeno pela gelatinase produzida por *E. faecalis* pode ter papel importante na patogênese e na propagação de inflamações periapicais, além de produzir a enzima hialuronidase que atua no ácido hialurônico encontrado no tecido conjuntivo humano, facilitando a disseminação bacteriana (da Silva *et al.*, 2011).

O MTA é composto por vários óxidos minerais e tem se mostrado superior a outros materiais usados na Endodontia em sua capacidade seladora frente a corantes, bactérias e endotoxinas (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2014). Estudos avaliaram a atividade antibacteriana do MTA cinza e branco, hidróxido de cálcio (HC), cimento Portland e um novo cimento (NEC) diante de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* e uma mistura dessas bactérias. Não houve diferença significativa entre NEC e HC, e também entre MTA e cimento Portland. No entanto, houve uma significativa diferença entre HC e NEC, em comparação com MTA e CP (Hasan Zarrabi *et al.*, 2009, Oliveira & Duque, 2013).

Pesquisadores analisaram a atividade antimicrobiana de diferentes cimentos contra *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *E. faecalis*. Os cimentos Sealapex, Sealer 26, Endo CPM Sealer e MTA branco apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados (da Silva *et al.*, 2011, Oliveira & Duque, 2013). Portanto, a avaliação dos aspectos microbianos do cimento MTA deve ser objeto de análise.

De acordo com Bosso-Martelo *et al.* (2016), a alcalinidade é uma característica relevante nos cimentos endodônticos. O pH alcalino induz a formação de tecido mineralizado, além de inibir o sistema enzimático microbiano, exercendo ação antimicrobiana (Costa *et al.*, 2014). A presença dos íons cálcio ativa a fosfatase alcalina, favorecendo o processo de mineralização. (Islam *et al.*, 2006, Asgary *et al.*, 2009, da Silva *et al.*, 2011).

O MTA é usado como cimento reparador devido ao seu pH alcalino (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2014). O óxido de cálcio, presente na sua composição, é fundamental para sua

atividade antimicrobiana. Quando associado à água, forma o hidróxido de cálcio, o qual dissocia os íons cálcio e hidroxila, elevando o pH inicial do MTA de 10,2 para 12,5, destruindo microorganismos resistentes como *E. faecalis* (Costa *et al.*, 2014). Tais propriedades já foram investigadas no CP puro (da Silva *et al.*, 2011). Estudos relataram resultados de pH semelhantes para o CP e MTA (Guerreiro-Tanomaro *et al.*, 2012; Guerreiro-Tanomaro *et al.*, 2014). Camilleri (2010) observou que o MTA e o CP associado a diferentes radiopacificadores promovem altos valores de pH.

Estudos comprovaram que o CP é bactericida, uma vez que possui pH altamente alcalino e mostrou-se eficaz no tratamento da polpa dentária em crianças com dentes decíduos, com vantagens terapêuticas e financeiras (da Silva *et al.*, 2011). Portanto, o pH, devido à sua relevante propriedade, não pode sofrer interferência negativa do radiopacificador utilizado em associação ao cimento Portland (Guerreiro-Tanomaro *et al.*, 2012; Guerreiro-Tanomaro *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2014).

A radiopacidade obtida na análise clínico-radiográfica depende da natureza do agente radiopacificador e da proporção em que o mesmo é adicionado ao cimento. Diante do exposto, o presente trabalho de pesquisa propôs-se a investigar a radiopacidade, a atividade antimicrobiana e o pH do MTA, do CP puro e do cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores em diferentes concentrações.

2. OBJETIVO

Avaliar a radiopacidade, a atividade antimicrobiana e o pH do MTA, do cimento Portland puro e do cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores em diferentes proporções.

3. METODOLOGIA

O tipo de estudo utilizado para a execução do presente projeto foi uma pesquisa *in vitro*. Primeiramente, avaliou-se a radiopacidade dos cimentos Agregado Trióxido Mineral (MTA), Cimento Portland puro (CP) e Cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores nas seguintes proporções: iodofórmio a 15%, 20% e 30%, óxido de chumbo a 15%, 20% e 30%, óxido de zircônio a 15%, 20% e 30%, subnitrato de bismuto a 15%, 20% e 30%, sulfato de bário a 15%, 20% e 30% e óxido de bismuto a 15%, 20% e 30%. (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2014) (Figura 1).

A proporção de 15% dos agentes radiopacificadores acima citados foi obtida por meio da adição de 1,5g do agente radiopacificador a 8,5g do CP; a proporção de 20%, através da adição de 2,0g do agente radiopacificador a 8,0g do CP; a proporção de 30%, adicionando-se 3,0g do agente radiopacificador a 7,0g do CP, conforme a figura 1.

Vaso 1	MTA	-
Vaso 2	Cimento Portland puro (10g)	-
Vaso 3	Cimento Portland (8,5g) + iodofórmio (1,5g)	15%
Vaso 4	Cimento Portland (8,0g) + iodofórmio (2,0g)	20%
Vaso 5	Cimento Portland (7,0g) + iodofórmio (3,0g)	30%
Vaso 6	Cimento Portland (8,5g) + óxido de chumbo (1,5g)	15%
Vaso 7	Cimento Portland (8,0g) + óxido de chumbo (2,0g)	20%
Vaso 8	Cimento Portland (7,0g) + óxido de chumbo (3,0g)	30%
Vaso 9	Cimento Portland (8,5g) + óxido de zircônio (1,5g)	15%
Vaso 10	Cimento Portland (8,0g) + óxido de zircônio (2,0g)	20%
Vaso 11	Cimento Portland (7,0g) + óxido de zircônio (3,0g)	30%
Vaso 12	Cimento Portland (8,5g) + subnitrato de bismuto (1,5g)	15%
Vaso 13	Cimento Portland (8,0g) + subnitrato de bismuto (2,0g)	20%
Vaso 14	Cimento Portland (7,0g) + subnitrato de bismuto (3,0g)	30%
Vaso 15	Cimento Portland (8,5g) + sulfato de bário (1,5g)	15%
Vaso 16	Cimento Portland (8,0g) + sulfato de bário	20%
Vaso 17	Cimento Portland (7,0g) + sulfato de bário (3,0g)	30%
Vaso 18	Cimento Portland (8,5g) + óxido de bismuto (1,5g)	15%
Vaso 19	Cimento Portland (8,0g) + óxido de bismuto (2,0g)	20%
Vaso 20	Cimento Portland (7,0g) + óxido de bismuto (3,0g)	30%

Figura 1. Quadro referente à disposição dos radiopacificadores e suas respectivas proporções.

3.1. Análise da radiopacidade

3.1.1. Confeção e montagem das amostras

As amostras foram confeccionadas utilizando placas de acrílico (10 mm X 30 mm) com espessuras de 1 mm, contendo quatro cavidades de 5 mm de diâmetro padrão ISO (Takeshita *et al.*, 2004), as quais foram preenchidas com MTA, CP puro e CP adicionado dos agentes radiopacificadores e respectivas proporções acima citados (figura 1), em forma de pó, com uso de balança analítica (QUIMIS Aparelhos Científicos Ltda., Diadema/SP, Brasil). Foram confeccionados três corpos de prova para cada proporção de material (figura 1), totalizando sessenta corpos de prova.

O MTA, o CP puro e o CP adicionado de partículas radiopacificadores em diferentes proporções, supracitadas (figura 1), foram inseridos nos orifícios das placas de acrílico seguindo uma sequência ordenada alfabeticamente, por meio de marcações feitas nas placas, de acordo com a primeira letra da marca comercial, utilizando-se uma espátula Thompson nº6 (Miltex, inc., Tuttlingen, Alemanha). O material foi pressionado por uma lâmina de vidro de 5 mm de espessura intermediada por uma lâmina plástica para transparência (Maxprint) do mesmo tamanho, cujo objetivo foi limitar a espessura do material a ser inserido e nivelar a superfície prevenindo a formação de bolhas. As placas (figura 2) foram protegidas por filme de PVC (Polivinil Carbono) visando prevenir contaminações do ambiente, tais como poeira, dentre outros (Takeshita *et al.*, 2004; Takeshita *et al.*, 2008).



Figura 2. Placa de acrílico, sensor digital e stepwedge (6063 alloy, ABNT).

3.1.2. Radiografia das amostras

Um *stepwedge* de alumínio de oito degraus (6063 alloy, ABNT) foi utilizado para correlacionar a densidade das imagens das amostras às do alumínio, permitindo verificar concordância com os requerimentos da *International Standard Organization* (ISO/DP 4049) para radiopacidade de materiais odontológicos.

Cada amostra foi radiografada ao lado do *stepwedge*, utilizando um sensor de placa de fósforo baseado em um sistema de radiografia digital semi-direto (Instrumentarium Kavo EXPRESS®, Joinvile/SC, Brasil), por meio de um aparelho de raios X odontológico (GNATUS® Timex 70 E, Ribeirão Preto/SP, Brasil), a uma distância foco-filme de 40 cm com 7 mA, 65 kVp e tempo de exposição de 0,1 s para cada placa (Takeshita *et al.*, 2013). (Figura 3).



Figura 3. Sistema de radiografia digital semi-direto (Instrumentarium Kavo EXPRESS®, Joinvile/SC, Brasil) com imagem piloto (Fonte: Ambulatório de Radiologia – UFS).

3.1.3. Leitura da radiopacidade.

Para a análise da radiopacidade dos cimentos, o programa utilizado foi o ImageTool® (versão 3.0, UTHSCSA, EUA). Todas as imagens foram capturadas com resolução fixa de 600 dpi (*dots per inch*) e arquivadas em formato *TIFF*. As imagens foram importadas para o programa Image Tool. A leitura da radiopacidade foi realizada em três diferentes áreas em cada amostra do cimento reparador (áreas padronizadas) e, no terceiro degrau equivalente a 3 mm do *stepwedge*, calculando-se os valores médios de densidade óptica em mmEq.Al. Para tanto foi utilizado a fórmula:

into millimeters of aluminum (mm Al) using the following equation described by Lachkowski and others:³

$$\frac{A \times 0.5}{B} + \text{mm Al below material's MG}$$

where:

- A:** MG of the material – the MG of the aluminum step wedge increment immediately below the material's MG.
- B:** MG of the aluminum step wedge increment immediately above the material's MG – MG of the aluminum stepwedge increment immediately below the material's MG.
- 0.5:** increment thickness of the aluminum stepwedge.

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os cimentos selecionados com radiopacidade mínima de 3.00 mmEq.Al (ANSI/ADA, nº57) foram o MTA e o CP adicionado dos agentes radiopacificadores iodofórmio a 20%, óxido de bismuto a 20%, subnitrito de bismuto a 20%, óxido de chumbo a 20% e óxido de zircônio a 30%. Tais cimentos foram submetidos aos testes de pH e de sensibilidade microbiana: microdiluição e difusão em ágar. Apesar do cimento Portland puro apresentar radiopacidade abaixo da normativa da ADA, também foram analisados o pH e atividade antimicrobiana, como parâmetro de avaliação. O quadro 1 apresenta a composição química e fabricantes dos materiais testados nesse estudo.

Quadro1: Materiais, composição química e fabricantes.

Material	Composição Química/Proporções	Fabricante
Cimento Portland	Silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato de cálcio-ferro, sulfato de cálcio, tricálcio aluminato, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, óxido de cálcio	Votorantin, São Paulo/SP, Brasil
MTA-Angelus®	Cimento Portland (8,0 g) Óxido de Bismuto (2,0 g)	Angelus, Londrina /PR, Brasil
CP + Iodofôrmio a 20%	Cimento Portland (8,0g) CHI ₃ (2,0g)	Biodinâmica, Ibitiporã/PR, Brasil
CP + Óxido de Bismuto a 20%	Cimento Portland (8,0g) Bi ₂ O ₃ (2,0g)	SP Labor, Campinas/SP, Brasil
CP + Subnitrato de Bismuto a 20%	Cimento Portland (8,0g) Bi ₅ O(OH) ₉ (NO ₃) ₄ (2,0g)	Vetec Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil
CP + Óxido de Chumbo a 20%	Cimento Portland (8,0g) PbO (2,0g)	Cetus Ltda, Santo Amaro/SP, Brasil
CP + Óxido de Zircônio a 30%	Cimento Portland (7,0g)	Sigma-Aldrich Brasil Ltda.,
	ZrO ₂ (3,0g)	São Paulo/SP, Brasil

3.2.1. Obtenção das linhagens de micro-organismos

No presente estudo, foram testadas seis cepas bacterianas clínicas de *Enterococcus faecalis* referenciadas: LMA 26 (8/B/1/5), LMA 27 (8/A/1/5), LMA 28 (8/A/1/4), LMA 29 (8/A/1/2), LMA 31 (8/C/1/2) e LMA 34 (8/B/1/1), isoladas de pacientes acometidos por infecção endodôntica, pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (LMA/DMO/UFS), além de uma linhagem padrão, procedente

da American Type Culture Collection (ATCC 29212) gentilmente cedida pelo INCQS/Fiocruz-RJ (Quadro 2).

Quadro 2 – Linhagens de *E. faecalis* disponibilizadas para uso em pesquisa pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (LMA/DMO/UFS).

Espécie	Linhagens
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMA 26 (8/B/1/5), LMA 27 (8/A/1/5), LMA 28 (8/A/1/4), LMA 29 (8/A/1/2), LMA 31 (8/C/1/2) e LMA 34 (8/B/1/1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212

Estas linhagens de *E. faecalis* encontram-se armazenadas em microtubos tipo eppendorfs de 1,5 ml (Laderquímica, Vitória/ES, Brasil) acondicionados em ultrafreezer a -80°C (REVCO, Smith Ave Everett/WA, Japan), no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (LMA/DMO/UFS), possibilitando o uso para a presente pesquisa (Figura 4).



Figura 4 - Freezer a -80°C e linhagens de *E. faecalis* acondicionadas em eppendorfs.

3.2.2. Revitalização das linhagens testes

As linhagens de *E. faecalis* supracitadas foram revitalizadas para uso nos testes de sensibilidade microbiana. As cepas foram inoculadas em tubos de ensaio de vidro (Byosistemas, Santa Cândida/PR, Brasil) contendo 3ml de caldo BHI (OXOID, São Paulo/SP, Brasil) (figura 5) e incubadas em estufa de cultivo microbiológico (Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda., Piracicaba/SP, Brasil) à temperatura de 37°C por 24 horas.

Após 24 horas, realizou-se o repique dos microorganismos, em placas de Petri de vidro estéreis (medição 20 x 150 mm) contendo ágar bile esculina (BBL – Interlab Distribuidora de Produtos Científicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil) (figura 5) e ágar nutriente (HIMEDIA – SP LABOR Equipamentos para Laboratórios Ltda., Presidente Prudente/SP, Brasil), para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação permaneceu 37°C por 24 horas (Figura 5).

As cepas microbianas foram coradas pela coloração de Gram em esfregaços previamente preparados. Ao microscópio óptico (Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), foram visualizados cocos Gram positivos, característicos das linhagens *E. faecalis*.

Após 24 horas, as colônias bacterianas foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri contendo ágar nutriente. Em seguida, foram incubadas sob as mesmas condições anteriores para produção de biomassa suficiente para o experimento.

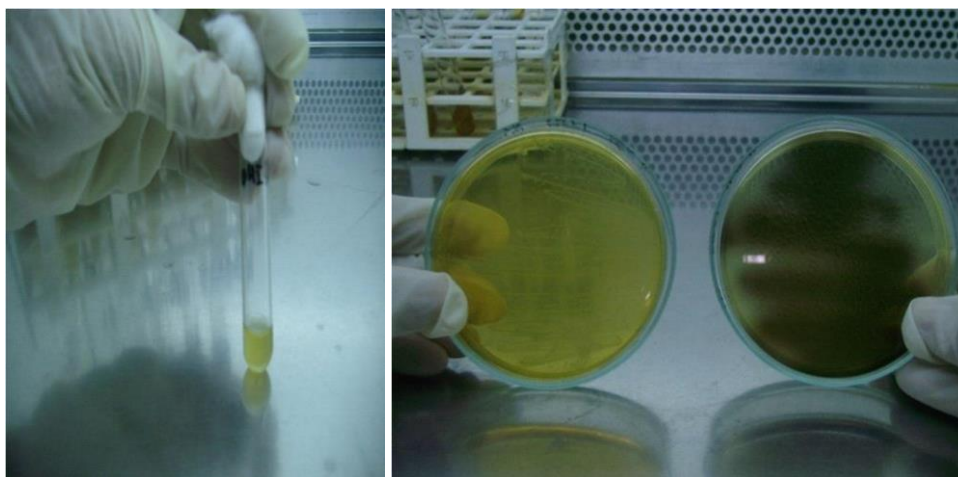


Figura 5 – Tubo de vidro com caldo BHI e placas de Petri contendo ágar simples e ágar bile esculina inoculados com colônias isoladas de *E. faecalis*, após 24 horas de incubação em estufa a 37°C por 24 horas.

3.2.3. Teste de microdiluição:

O método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessária para inibir a reprodução ou matar um micro-organismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas.

A menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM impede o crescimento visível de um micro-organismo no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo. A CIM bactericida destrói os micro-organismos; a CIM bacteriostática, inibe a reprodução bacteriana, não provocando a eliminação dos mesmos.

Os testes de microdiluição foram baseados no protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2005) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que consistem inicialmente na elaboração da suspensão microbiana ajustada para uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC em caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA – SP LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil) estéril tamponado com Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg).

A técnica de microdiluição compreende o uso de pequenos volumes de meio de cultura líquido colocados em microplacas de microtitulação contendo 96 poços de fundo em forma de U estéreis (CRAL Artigos para Laboratório Ltda., Cotia/SP, Brasil), próprias para microdiluição.

As colônias bacterianas foram obtidas a partir de culturas recentes dos microorganismos (24 horas a 37°C). Em seguida, foram preparadas suspensões bacterianas. As colônias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%). Estas suspensões foram homogeneizadas em agitador de tubos vórtex (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba/SP, Brasil) durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada, com o auxílio do cartão de Wickman (+/- 0,5), para alcançar o padrão 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL) (Figura 6).

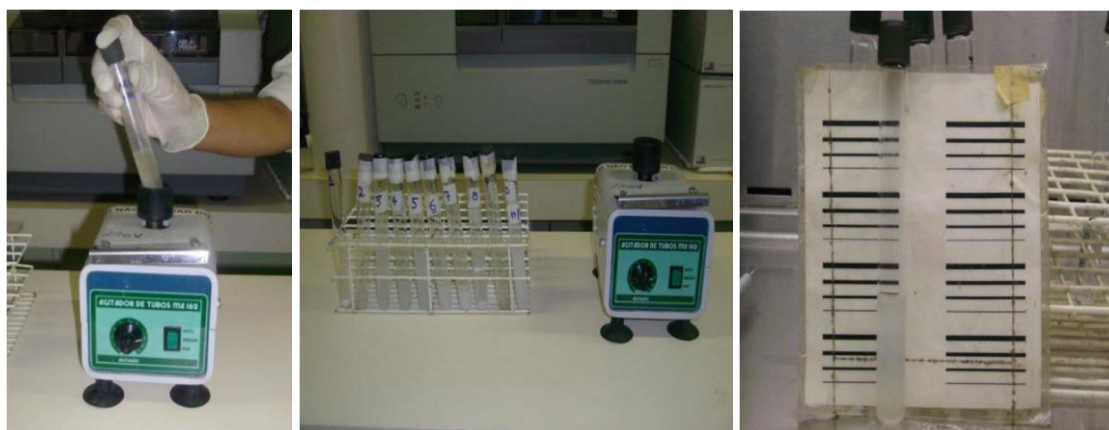


Figura 6 – Tubo com linhagem de *E. faecalis* inoculada em salina no agitador de tubos, escala nefelométrica de Mc Farland e cartão de Wickman.

Para a preparação das diluições bacterianas desta pesquisa, foi realizada uma inoculação direta das suspensões bacterianas de *E. faecalis* em caldo Mueller-Hinton (tamponado com Ca e Mg). Por meio de ponteiros (PROLAB materiais para laboratório, São Paulo/SP, Brasil) adaptadas em micropipetas monocal volume variável (LABMATE, São Paulo/SP, Brasil), devidamente calibradas, foram realizadas as diluições e inoculações. A diluição bacteriana 1:50 foi obtida através da adição de 2,5 µl da suspensão bacteriana padronizada ($1,0 \times 10^8$) a 122,5 µl da solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) em tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 2375 µl do Caldo Mueller Hinton (tamponado com Ca e Mg), obtendo-se 2500µl, correspondentes à diluição bacteriana 1:20, com concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Os compostos detríticos do MTA, CP e do CP adicionado de agentes radiopacificadores foram preparados numa concentração estoque de 10.000µg/mL (solução padrão), na proporção: 25 mg do MTA ou do CP ou do CP adicionado dos respectivos radiopacificadores testados para 5ml de água destilada estéril.

Esse protocolo foi iniciado numa concentração de 640 µg/µL, do MTA, CP e CP adicionados dos respectivos radiopacificadores, perfazendo uma taxa entre 640 µg/mL a 0,625 µg/mL. Para tanto, as soluções padrão (estoques) foram diluídas em caldo MuellerHinton estéril (tamponado com Ca e Mg), obtendo-se as seguintes concentrações: 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2, 5 µg/mL, 1, 25 µg/mL, 0, 625 µg/mL, totalizando 11 concentrações de compostos detríticos.

A concentração 640 µg/mL foi obtida adicionando-se 7ml do caldo Mueller-Hinton a 1ml da solução padrão (estoque). A concentração 320 µg/mL foi obtida adicionando-se 1ml da concentração 640 µg/mL a 1 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 160 µg/mL foi obtida adicionando-se 1ml da concentração 640 µg/mL a 3ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 80 µg/mL foi obtida adicionando-se 1ml da concentração 160 µg/mL a 1 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 40 µg/mL foi obtida adicionando-se 0,5 ml da concentração 160 µg/mL a 1,5 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 20 µg/mL foi obtida adicionando-se 0,5 ml da concentração 160 µg/mL a 3,5 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 10 µg/mL foi obtida adicionando-se 1,0 ml da concentração 20 µg/mL a 1,0 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 5 µg/mL foi obtida adicionando-se 0,5ml da concentração 20 µg/mL a 0,5 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 2,5 µg/mL foi obtida adicionando-se 0,5 ml da concentração 20 µg/mL a 3,5ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 1,25 µg/mL foi obtida adicionando-se 1,0ml da concentração 2,5 µg/mL a 1,0 ml do caldo Mueller-Hinton. A concentração 0,625 µg/mL foi obtida adicionando-se 0,5 ml da concentração 2,5 µg/mL a 1,5 ml do caldo Mueller-Hinton.

O experimento foi realizado em duplicata, utilizando placas de microtitulação de 96 poços. As linhas de poços representados pelas letras A-H são as linhas de poços horizontais. As linhas de poços representados pelos números 1-12 são as linhas de poços verticais. Assim sendo, os poços representados pelas letras A da microplaca foram inoculados com 100µl da diluição 1:20 da cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212); os poços representados pelas letras B a G, foram preenchidos com 100µl das diluições 1:20 das linhagens clínicas de *E. faecalis* (LMA 26, LMA 27, LMA 28, LMA 29, LMA 31 e LMA 34), respectivamente. Nos poços representados pelos números 1 a 11 foram depositadas as 11 concentrações dos compostos detríticos (640 a 0,625µg/ml).

Para padronização do teste, foram realizados os controles positivo e negativo. Os poços representados pela letra H, referentes ao controle positivo, foram preenchidos com 100µl de caldo Mueller-Hinton, aos quais foram adicionados 100µl da solução-padrão do cimento testado. Nos poços representados pela linha 12, foram depositados 100µl do caldo Mueller-Hinton, os quais foram adicionados aos 100µl das diluições 1:20 das linhagens de *E. faecalis* inoculados anteriormente. Estes poços correspondem ao controle negativo (Figuras 7 e 8).

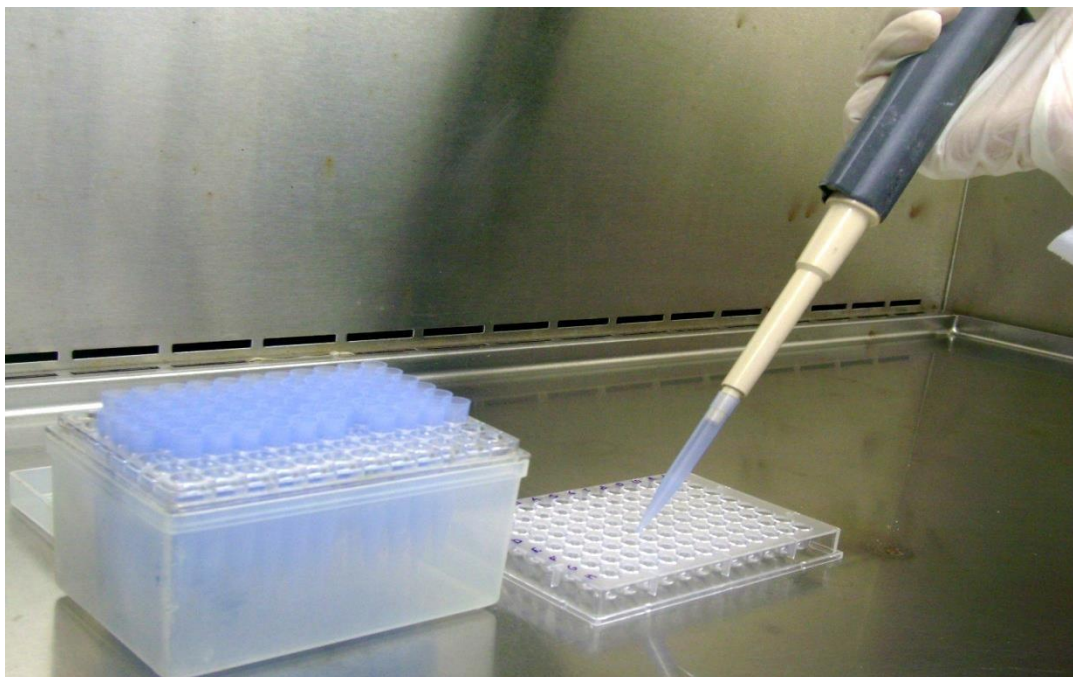


Figura 7 – Micropipeta, ponteiras e placa de microtitulação com 96 poços.

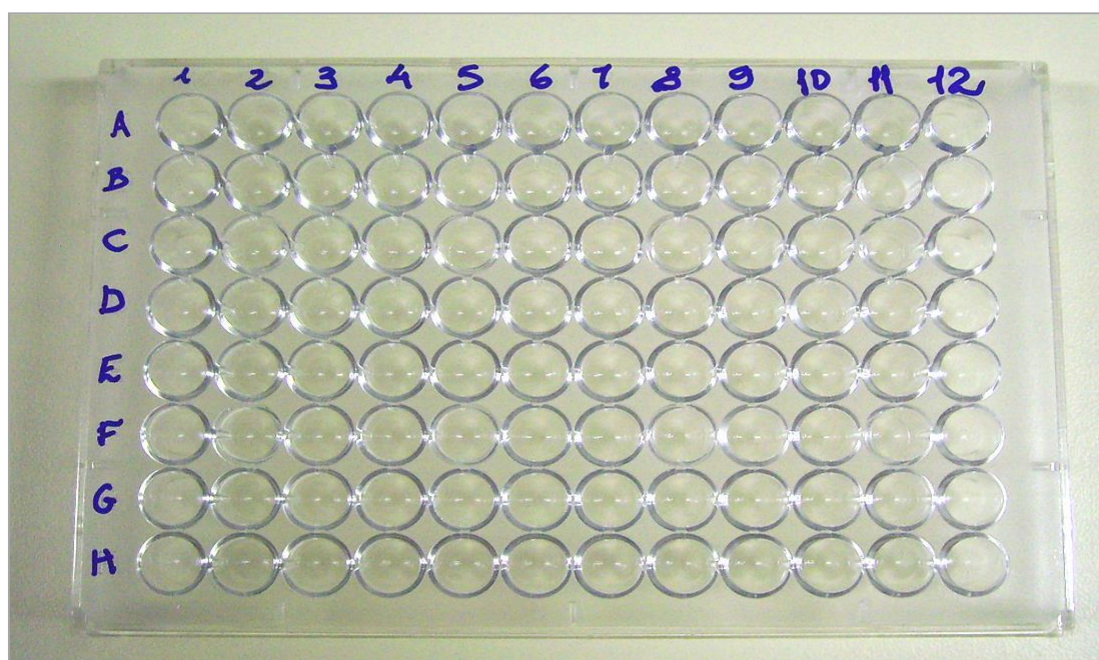


Figura 7 - Placa de microtitulação com 96 poços (microplaca).

As placas de microdiluição foram identificadas com caneta marcadora multiuso (Comércio e Importação Sertic Ltda., São Paulo/SP, Brasil), envoltas com filme de PVC transparente (Prezunic Mercadoria de Consumo e Varejo Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil) e incubadas a 37°C numa estufa de cultivo microbiológico (Figura 8).

Os resultados foram avaliados após 24 e 48 horas. A leitura de 24 horas foi definida como ponto de corte.



Figura 8 - Placas de microtitulação, em duplicata, envoltas com PVC e incubadas em estufa de cultivo microbiológico.

O crescimento em cada poço foi determinado numa escala de turvação:

Escala 0 – ausência de crescimento nos poços.

Escala 1 – Leve turbidez quando comparado com o controle positivo.

Escala 2 – Proeminente decréscimo na turbidez quando comparado com o controle positivo (aproximadamente 50% de inibição).

Escala 3 – Leve redução na turbidez quando comparado com o controle positivo (aproximadamente 90% de inibição).

Escala 4 – Não há redução na turbidez quando comparado com o controle positivo.

Define-se a concentração inibitória mínima (CIM) bacteriostática como a concentração mais baixa da droga que promove ligeira turbidez do meio de cultura (escala 1). A CIM bactericida é considerada a mais baixa concentração, na qual o meio de cultura apresenta-se totalmente claro, translúcido (escala 0).

Leitura visual dos poços das placas de microtitulação (Figura 9):

1º caso: quando surge um poço com sedimentação branca no fundo e limpidez ao redor, esta concentração é considerada a MIC bactericida: mata as bactérias;

2º caso: quando surge um poço com sedimentação branca no fundo, área meio turva ao redor e essa turbidez vai diminuindo pico a pico até aparecer menos turvo, esta concentração é considerada MIC bacteriostática: não mata, apenas estabiliza o crescimento bacteriano;

3º caso: quando a turbidez ao redor é similar ou mais forte que a turbidez da sedimentação depositada no fundo do poço, esta concentração não inibiu o crescimento bacteriano, não teve ação e, obviamente, não matou os micro-organismos. É a ação esperada no controle positivo.

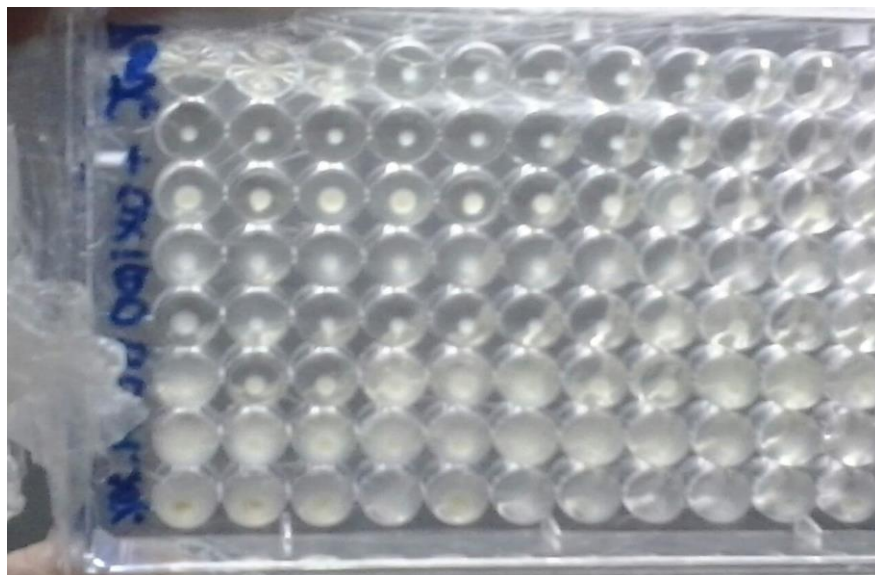


Figura 9. Placa de microtitulação inoculada e envolta com PVC após 24 horas de incubação a 37°C por 24 horas.

3.2.4. Teste de difusão em Ágar

Segundo Ostrosky *et al.* (2007), o teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (Pinto *et al.*, 2003).

Os cimentos selecionados com radiopacidade satisfatória (ANSI/ADA nº57) (quadro1) e o medicamento genérico (amoxicilina (875 mg) + clavulonato de potássio (125 mg) - EMS S/A Hortolândia/SP), usado para controle positivo, foram manipulados em placa de vidro estéril (Daufenbach, Dental Web, Porto Alegre/RS, Brasil) com auxílio de uma espátula metálica (Dentsply Maillefer, Rio de Janeiro/RJ, Brasil), na proporção de 0,14g de pó para 1 gota de água destilada estéril.

As cepas de *E. faecalis* testadas neste estudo estão descritas no quadro 2. Os microrganismos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 3ml de caldo BHI (OXOID Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) obedecendo às suas características fisiológicas, sendo incubados em estufa de cultivo microbiológico a 37° C por 24 horas. Após a incubação, os esfregaços foram preparados e corados pela coloração de Gram. Ao microscópio ótico, foram visualizados cocos Gram positivos, típicos das linhagens de *E. faecalis*.

Posteriormente, as colônias bacterianas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas a 37°C x 24 horas para comprovar a “pureza” da cultura e produzir biomassa para o experimento. Após esse período, as colônias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5ml de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%). As suspensões resultantes foram colocadas em agitador de vórtex durante 15 segundos e a densidade celular foi ajustada, com o auxílio do cartão de Wickman (+/- 3.0), padronizando os inóculos de acordo com o tubo 3.0 da escala de Mc Farland 3.0 (Oplustil *et al.*, 2000; Koneman, 2001), equivalente a 9×10^8 UFC/ml).

Para a execução do teste de difusão em ágar, foi realizada a preparação do meio de cultura, ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA SP LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil). Posteriormente, o mesmo foi distribuído em placas de Petri (20 x 140 mm de diâmetro), com volume suficiente para atingir 4mm de espessura. Após a solidificação do meio de cultura, as suspensões microbianas foram inoculadas em cada placa contendo ágar Muller-Hinton, com auxílio de cotonetes estéreis (Johnson&Johnson, São José dos Campos/SP, Brasil), por meio da

técnica de semeadura de superfície, em três sentidos: horizontal, vertical e diagonal, para evitar o crescimento de colônias isoladas.

Em seguida, foram confeccionados cinco poços equidistantes, com 4mm de profundidade, nas placas contendo ágar Mueller-Hinton e devidas inoculações bacterianas. Para tal procedimento, fez-se uso de canudos plásticos (Plascobril Sacolas Brilhante Ltda, Orleans/SC, Brasil), de forma a padronizar o diâmetro da perfuração. Com um porta-amálgama plástico autoclavável virgem estéril (Maquira indústria de produtos odontológicos Ltda, Maringá/PR, Brasil), os poços foram completamente preenchidos com os respectivos materiais a serem testados, devidamente espatulados.

Para padronização do teste, foram realizados os controles positivo e negativo. Como controle negativo, um poço foi preenchido com a suspensão da cepa bacteriana testada em caldo Mueller-Hinton. Como controle positivo, outro poço foi preenchido com um quimioterápico, o medicamento genérico (amoxicilina (875mg) + clavulonato de potássio (125 mg) (EMS S/A Hortolândia/SP, Brasil) diluído em água destilada.

As placas contendo os poços preenchidos com os materiais testes e inoculações bacterianas foram identificadas com canetas marcadoras multiuso (Importação Sertic Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e incubadas em estufa de cultivo microbiológico à temperatura de 37°C por 48h. Transcorrido o tempo, as placas de Petri foram analisadas, sendo medidos, em milímetros, os halos de inibição do crescimento microbiano formados no ágar. A primeira leitura dos halos de inibição do crescimento bacteriano foi realizada com 24 horas, sendo confirmada a leitura com 48 horas.

Os resultados foram obtidos através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos (NCCLS, 2003), o tamanho da zona de inibição foi mensurado por meio de paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo/SP, Brasil) e expressos em milímetros (Carvalho-Júnior *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2000).

Todo o protocolo de ambos os testes foi desenvolvido assepticamente numa capela de fluxo laminar (Labconco Life Science, São Paulo/SP, Brasil), pertencente ao laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (Figura 10).



Figura 10 - Capela de fluxo laminar (LMA/DMO/UFS).

3.3. Análise do pH

Os cimentos selecionados com radiopacidade adequada (ANSI/ADA nº57) (quadro 1), foram submetidos ao teste de pH. Apesar do cimento Portland apresentar radiopacidade abaixo da normativa da ADA, também foi realizada a aferição do pH. Foram pesados 2,5g de cada cimento em balança (Bel Engineering S.R.L., Monza/MB, Itália). Em seguida, foram depositados em frascos de vidro, nos quais foram adicionados 50 ml de água destilada. Estes frascos foram vedados com papel alumínio (Instituto GBarbosa Ltda., Aracaju/SE, Brasil), acondicionados em bandeja plástica contendo água destilada e incubados a 37°C.

As aferições do pH foram realizadas imediatamente após a pesagem, e após 24h, 72h, 7 dias e 15 dias, em 3 diferentes períodos, utilizando um pHmetro digital calibrado (pH Meter Pocket-sized, LOHAND, China). (Figura 11). A cada aferição do pH, procedia-se com a substituição da água destilada da bandeja plástica onde os frascos com as amostras estavam acondicionados.



Figura 11 - pH meter Pocket-sized, LOHAND, China.

3.4. Análise estatística

Para avaliação da radiopacidade e o pH foi realizado o teste Shapiro-Wilk de normalidade, em vista disso foi utilizado a análise de variância ANOVA e teste Tukey a nível de significância de 5%.

Original Research

Avaliação da radiopacidade, pH e atividade antimicrobiana do MTA, cimento Portland puro e adicionado de agentes radiopacificadores.

Marta Judite Nunes Lima, DDS¹

Jéssika Ingrid Gomes Malta²

Andemilson Santos Silva³

Antônio Márcio Barbosa Júnior, DDS⁴

Wilton Mitsunari Takeshita, DDS, Msc, PhD⁵

1 Estudante de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

2 Estudante de Odontologia, Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

3 Estudante de Biologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

4 Professor, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

5 Professor, Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

Endereço para Correspondência: Prof. Dr. Wilton Mitsunari Takeshita. Universidade Federal de Sergipe, Hospital Universitário, Departamento de Odontologia. Rua Cláudio Batista, s/n.

Bairro Sanatório. Aracaju, Sergipe, Brasil. CEP: 49060-100.

Resumo

Objetivo: Avaliar a radiopacidade, atividade antimicrobiana e pH do MTA, Cimento Portland puro (CP) e CP adicionado de radiopacificadores. **Materiais e Métodos:** Avaliou-se a radiopacidade do MTA, CP e CP adicionado dos radiopacificadores: iodofórmio, óxido de chumbo, óxido de zircônio, subnitrato de bismuto, sulfato de bário e óxido de bismuto nas proporções 15%, 20% e 30%. O CP e cimentos selecionados (ANSI/ADA nº 57) foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana e do pH. A radiopacidade foi avaliada pelo sistema de radiografia digital semi-direto (Instrumentarium Kavo EXPRESS®). A atividade antimicrobiana foi analisada pelos testes de microdiluição e difusão em ágar. O microorganismo testado foi o *Enterococcus faecalis*. O pH foi aferido com pHmetro digital (pH Meter Pocket-sized). Os testes estatísticos utilizados foram: Shapiro-Wilk de normalidade, análise de variância ANOVA e Tukey a nível de significância de 5%. **Resultados:** O CP puro e CP + óxido de bismuto a 20% apresentaram, respectivamente, o menor e maior valor de radiopacidade. No teste de microdiluição, os cimentos proporcionaram atividade bactericida e bacteriostática contra cepas de *E. faecalis*. No teste de difusão em ágar, a maioria das cepas testadas não foi inibida pelos cimentos. Todos os cimentos apresentaram alcalinidade. O MTA apresentou os menores valores de pH. **Conclusões:** O MTA e as concentrações de CP adicionado de 20% do agente radiopacificador subnitrato de bismuto e CP adicionado do agente radiopacificador iodofórmio, 20% em peso, proporcionaram radiopacidade satisfatória, alcalinizaram o meio e promoveram atividades bactericida e bacteriostática contra as cepas de *E. faecalis* testadas.

Significância clínica: Apresentar um material com propriedades semelhantes ou melhores do que o MTA, uma alternativa de baixo custo.

Palavras-chaves: Radiografia digital; Materiais biocompatíveis; pH; Testes de sensibilidade microbiana.

1. Introdução

A radiopacidade é uma propriedade obrigatória em todos os materiais odontológicos [1]. Necessária para a interpretação radiográfica dos materiais restauradores, cáries, contato com o dente adjacente e distinção entre material forrador ou restaurador de vazios e fendas [2, 3, 4].

O agregado trióxido mineral (MTA) é composto por óxidos minerais, com excelentes propriedades físicas e biológicas [5, 6], indicado para o tratamento de acidentes e complicações endodônticas: capeamento pulpar, reparação das perfurações, reabsorção radicular, apicificação e cirurgia oral [7, 8, 9]. Considerado padrão ouro, conforme da Silva *et al.*, (2015) [10] e Souza *et al.*, (2015) [8].

O Cimento Portland (CP) usado na construção civil pode substituir o formocresol e o MTA [11]. Constituído por silicatos de cálcio, alumínio, ferro, fases de clínquer e outros compostos, apresenta biocompatibilidade [12, 13], composição química e propriedades físicas semelhantes ao MTA [14], exceto pela partícula radiopacificadora [15, 16]. Devido ao baixo custo, tem sido proposto como material alternativo para obturação retrógrada do canal radicular [14, 17]

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* [18] surgiram diante da possibilidade de se estender os benefícios desse cimento à população com menor poder aquisitivo [10]. Porém, a baixa radiopacidade do CP [19], limita a visualização radiográfica após sua inserção no canal radicular, dificultando a sua distinção das estruturas anatômicas adjacentes, de outros materiais, de lesões de cárie e de outras alterações [11, 20, 21].

A fim de resolver este problema, agentes radiopacificadores, normalmente utilizados em materiais dentários, têm sido propostos para serem agregadas ao CP [11, 22, 23, 24, 25]. O resultado é de importância clínica, pois interessa ao radiologista e, especialmente, ao clínico.

Em 1981, o Conselho em Materiais Dentários e Aparelhos da *American Dental Association* (ADA), em concordância com a especificação nº27 publicada em 1977, afirmou que

a radiopacidade é um requisito necessário em materiais restauradores [26]. A normatização da ISO (*International Organization for Standardization*) certifica que a radiopacidade mínima de um material restaurador na espessura de 2 mm deve ser igual ou maior do que a de 2 mm de densidade de um *stepwedge* de alumínio [26]. A especificação nº 57 da ANSI/ADA (2000) recomenda que um material endodôntico apresente radiopacidade mínima de 3 mmEq.Al [20].

Além da radiopacidade, a atividade antimicrobiana e alcalinidade são características imprescindíveis nos materiais obturadores [20]. Em amostras coletadas durante o tratamento endodôntico e nos casos de retratamento de canais obturados com insucesso, foram identificadas bactérias entéricas anaeróbias facultativas [27]. Dentre as cepas resistentes, o *Enterococcus faecalis* é o micro-organismo mais comumente isolado. [10, 14, 28, 29, 30]. O *E. faecalis* é uma bactéria gram positiva, normalmente encontrada no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros mamíferos, bem como nos canais radiculares de dentes afetados por lesões periapicais persistentes [29, 30].

O MTA supera os demais materiais usados na Endodontia em sua capacidade seladora frente a corantes, bactérias e endotoxinas [11, 12, 14, 15, 22, 31, 32, 33]. O MTA e o CP exercem atividade antibacteriana contra o *E. faecalis*. As infecções endodônticas persistentes determinam a necessidade da pesquisa de novas moléculas antimicrobianas [34]. Portanto, a avaliação dos aspectos microbianos do cimento MTA e do CP deve ser objeto de análise.

O pH alcalino induz a formação de tecido mineralizado, além de inibir o sistema enzimático microbiano, exercendo ação antimicrobiana. O MTA é usado como cimento reparador devido ao seu pH alcalino [20]. Estudos [11, 35] relataram resultados de pH semelhantes para o CP e MTA.

Pesquisas comprovaram a atividade bactericida e alcalinidade do CP, além da eficácia no tratamento da polpa dentária de decíduos, com vantagens terapêuticas e financeiras [20]. Camilleri [36] observou que o MTA e o CP associado a diferentes radiopacificadores promovem altos valores de pH. Portanto, o pH, devido à sua característica relevante, não pode sofrer interferência negativa do radiopacificador agregado ao CP [11, 35].

A radiopacidade obtida na análise clínico-radiográfica depende da natureza do agente radiopacificador e da proporção em que o mesmo é adicionado ao cimento. Este estudo propõe-

se a investigar a radiopacidade, a atividade antimicrobiana e o pH do MTA, cimento Portland puro e do cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores em diferentes proporções.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos materiais-testes

Avaliou-se a radiopacidade do MTA, CP puro e CP adicionado de agentes radiopacificadores: iodofórmio, óxido de chumbo, óxido de zircônio, subnitrato, sulfato de bário, óxido de bismuto nas proporções de 15%, 20% e 30% [11]. Tais proporções foram obtidas por meio da adição de 1,5g, 2,0g e 3,0g do agente radiopacificador a 8,5g, 8,0g e 7,0g do CP, respectivamente, conforme a figura 1.

Vaso 1	MTA	-
Vaso 2	Cimento Portland puro (10g)	-
Vaso 3	Cimento Portland (8,5g) + iodofórmio (1,5g)	15%
Vaso 4	Cimento Portland (8,0g) + iodofórmio (2,0g)	20%
Vaso 5	Cimento Portland (7,0g) + iodofórmio (3,0g)	30%
Vaso 6	Cimento Portland (8,5g) + óxido de chumbo (1,5g)	15%
Vaso 7	Cimento Portland (8,0g) + óxido de chumbo (2,0g)	20%
Vaso 8	Cimento Portland (7,0g) + óxido de chumbo (3,0g)	30%
Vaso 9	Cimento Portland (8,5g) + óxido de zircônio (1,5g)	15%
Vaso 10	Cimento Portland (8,0g) + óxido de zircônio (2,0g)	20%
Vaso 11	Cimento Portland (7,0g) + óxido de zircônio (3,0g)	30%
Vaso 12	Cimento Portland (8,5g) + subnitrato de bismuto (1,5g)	15%
Vaso 13	Cimento Portland (8,0g) + subnitrato de bismuto (2,0g)	20%
Vaso 14	Cimento Portland (7,0g) + subnitrato de bismuto (3,0g)	30%
Vaso 15	Cimento Portland (8,5g) + sulfato de bário (1,5g)	15%
Vaso 16	Cimento Portland (8,0g) + sulfato de bário	20%
Vaso 17	Cimento Portland (7,0g) + sulfato de bário (3,0g)	30%
Vaso 18	Cimento Portland (8,5g) + óxido de bismuto (1,5g)	15%
Vaso 19	Cimento Portland (8,0g) + óxido de bismuto (2,0g)	20%
Vaso 20	Cimento Portland (7,0g) + óxido de bismuto (3,0g)	30%

Figura 1. Disposição dos radiopacificadores e suas respectivas proporções.

2.2. Análise da radiopacidade

2.2.1. Confeção e montagem das amostras

Para confecção das amostras foram utilizadas placas de acrílico (10 mm X 30 mm) com espessuras de 1 mm, contendo quatro cavidades de 5 mm de diâmetro, as quais foram preenchidas com MTA, CP puro e CP adicionado dos agentes radiopacificadores (figura 1), em forma de pó, com uso de balança analítica (QUIMIS Aparelhos Científicos Ltda., Diadema/SP, Brasil). Foram confeccionados três corpos de prova para cada proporção de material (figura 1), totalizando sessenta corpos de prova.

Os cimentos foram inseridos nos orifícios das placas de acrílico seguindo uma sequência ordenada alfabeticamente, por meio de marcações feitas nas placas, de acordo com a primeira letra da marca comercial, utilizando-se uma espátula Thompson nº6 (Miltex, inc., Tuttlingen, Alemanha). O material foi pressionado por uma lâmina de vidro de 5 mm de espessura intermediada por uma lâmina plástica para transparência (Maxprint) do mesmo tamanho, cujo objetivo foi limitar a espessura do material a ser inserido e nivelar a superfície prevenindo a formação de bolhas. As placas foram protegidas por filme de PVC (Polivinil Carbono) visando prevenir contaminações do ambiente, tais como poeira, dentre outros.

2.2.2. Radiografia das amostras

Um *stepwedge* de alumínio de oito degraus (6063 alloy, ABNT) foi utilizado para correlacionar a densidade das imagens das amostras às do alumínio, permitindo verificar concordância com os requerimentos da *International Standard Organization* (ISO/DP 4049) para radiopacidade de materiais odontológicos.

Cada amostra foi radiografada ao lado do *stepwedge*, utilizando um sensor de placa de fósforo baseado em um sistema de radiografia digital [37] semi-direto (Instrumentarium Kavo EXPRESS®, Joinville/SC, Brasil), por meio de um aparelho de raios X odontológico (GNATUS® Timex 70 E, Ribeirão Preto/SP, Brasil), a uma distância foco-filme de 40 cm com 7 mA, 65 kVp e tempo de exposição de 0,1 s para cada placa.

2.2.3. Leitura da radiopacidade

Para a análise da radiopacidade dos cimentos, o programa utilizado foi o Image Tool® (versão 3.0, UTHSCSA, EUA). Todas as imagens foram capturadas com resolução fixa de 600

dpi (*dots per inch*) e arquivadas em formato *TIFF*. As imagens foram importadas para o programa Image Tool. A leitura da radiopacidade foi realizada em três diferentes áreas em cada amostra do cimento reparador (áreas padronizadas) e comparadas com o stepwedge para obtenção dos valores em mmEq.Al. Para tanto foi utilizado a fórmula:

into millimeters of aluminum (mm Al) using the following equation described by Lachkowski and others:³

$$\frac{A \times 0.5}{B} + \text{mm Al below material's MGv}$$

where:

- A:** MGv of the material – the MGv of the aluminum step wedge increment immediately below the material's MGv.
- B:** MGv of the aluminum step wedge increment immediately above the material's MGv – MGv of the aluminum stepwedge increment immediately below the material's MGv.
- 0.5:** increment thickness of the aluminum stepwedge.

2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

O MTA e CP adicionado dos radiopacificadores iodofórmio a 20%, óxido de bismuto a 20%, subnitrato de bismuto a 20%, óxido de chumbo a 20% e óxido de zircônio a 30% foram selecionados (ANSI/ADA nº 57) e submetidos aos testes de sensibilidade microbiana: microdiluição e difusão em ágar. Apesar da radiopacidade do CP estar abaixo da normativa da ADA, foram analisadas a atividade antimicrobiana e o pH, como parâmetro de avaliação. O quadro 1 apresenta a composição química e fabricantes dos materiais testados nesse estudo.

Quadro 1. Materiais, composição química e fabricantes.

Material	Composição Química/Proporções	Fabricante
----------	----------------------------------	------------

Cimento Portland	Silicato tricálcio, silicato dicálcio, aluminato de cálcio-ferro, sulfato de cálcio, tricálcio aluminato, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, óxido de cálcio	Votorantin, São Paulo/SP, Brasil.
MTA-Angelus®	Cimento Portland (8,0 g) Óxido de Bismuto (2,0 g)	Angelus, Londrina /PR, Brasil.
CP + Iodofòrmio a 20%	Cimento Portland (8,0g) CHI ₃ (2,0g)	Biodinâmica, Ibiporã/PR, Brasil.
CP + Óxido de Bismuto a 20%	Cimento Portland (8,0g) Bi ₂ O ₃ (2,0g)	SP Labor, Campinas/SP, Brasil.
CP + Subnitrato de Bismuto a 20%	Cimento Portland (8,0g) Bi ₅ O(OH) ₉ (NO ₃) ₄ (2,0g)	Vetec Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
CP + Óxido de Chumbo a 20%	Cimento Portland (8,0g) PbO (2,0g)	Cetus Ltda, Santo Amaro/SP, Brasil.
CP + Óxido de Zircônio a 30%	Cimento Portland (7,0g) ZrO ₂ (3,0g)	Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo/SP, Brasil.

2.3.1. Obtenção das linguagens de micro-organismos

Foram testadas seis cepas bacterianas clínicas de *Enterococcus faecalis* referenciadas: LMA 26 (8/B/1/5), LMA 27 (8/A/1/5), LMA 28 (8/A/1/4), LMA 29 (8/A/1/2), LMA 31 (8/C/1/2) e LMA 34 (8/B/1/1), isoladas de pacientes acometidos por infecção endodôntica, pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (LMA/DMO/UFS), além de uma linhagem padrão, procedente da American Type Culture Collection (ATCC 29212) gentilmente cedida pelo INCQS/Fiocruz RJ (Quadro 2).

Quadro 2 – Linhagens de *E. faecalis* disponibilizadas para uso em pesquisa LMA/DMO/UFS.

Espécie	Linhagens
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMA 26 (8/B/1/5), LMA 27 (8/A/1/5), LMA 28 (8/A/1/4), LMA 29 (8/A/1/2), LMA 31 (8/C/1/2) e LMA 34 (8/B/1/1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212

2.3.2. Revitalização das linhagens testes:

As cepas de *E. faecalis* foram revitalizadas em caldo BHI (OXOID Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e incubadas em estufa de cultivo microbiológico (Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda., Piracicaba/SP, Brasil) à 37°C por 24 horas. Em seguida, foram repicadas em ágar bile esculina (BBL – Interlab Distribuidora de Produtos Científicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil) distribuído em placas de Petri. A temperatura de incubação permaneceu 37°C por 24 horas. Foram preparados esfregaços das colônias isoladas, os quais foram corados pela coloração de gram. Ao microscópio óptico (Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil), foram visualizados cocos gram positivos, característicos das linhagens *E. faecalis*.

2.3.3. Teste de microdiluição

Os testes de microdiluição foram baseados no protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2005) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consistem na elaboração da suspensão microbiana ajustada para uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC em caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA – SP LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil) estéril tamponado com Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg).

As colônias bacterianas de *E. faecalis* (quadro 2) foram obtidas a partir de culturas recentes dos micro-organismos (37°C por 24 horas) e inoculadas em tubos de ensaio contendo

5mL de solução salina estéril a 0,85%. As suspensões bacterianas foram homogeneizadas em agitador de tubos vórtex (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba/SP, Brasil) durante 15 segundos. A densidade celular foi ajustada, com o auxílio do cartão de Wickman (+/- 0,5), para alcançar o padrão 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL) [38].

A diluição bacteriana 1:50 foi obtida por meio da adição de 2,5 µl da suspensão bacteriana padronizada (1×10^8) a 122,5 µl da solução salina estéril. Foram adicionados 2375 µl do Caldo Mueller-Hinton (tamponado com Ca e Mg), obtendo-se 2500µl, correspondentes à diluição bacteriana 1:20, com concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Os compostos detriticos dos cimentos testados (quadro 1) foram preparados numa concentração estoque de 10.000µg/mL (solução padrão), na proporção de 25 mg do cimento para 5ml de água destilada estéril. Esse protocolo foi iniciado numa concentração de 640 µg/ml de cada cimento, perfazendo uma taxa entre 640 µg/mL a 0,625 µg/mL. Para tanto, as soluções padrão (estoques) foram diluídas em caldo Mueller-Hinton estéril (tamponado com Ca e Mg), obtendo-se as seguintes concentrações: 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2, 5 µg/mL, 1, 25 µg/mL, 0, 625 µg/mL.

O experimento foi realizado em duplicata, utilizando placas de microtitulação (microplacas) contendo 96 poços de fundo em forma de U estéreis (CRAL Artigos para Laboratório Ltda., Cotia/SP, Brasil), próprias para microdiluição. Nestes poços, foram inoculados 100µl da diluição bacteriana 1:20 + 100µl dos compostos detriticos (640 a 0,625 µg/mL), através de ponteiras (AXYGEN – PROLAB materiais para laboratório, São Paulo/SP, Brasil) adaptadas em micropipetas monocal volume variável (LABMATE Made By HTL, São Paulo/SP, Brasil).

Para padronização da CIM, foram realizados os controles positivos (100µl de caldo Mueller-Hinton + 100µl da solução-padrão) e controles negativos (100µl do caldo MuellerHinton + 100µl das diluições bacterianas 1:20).

As placas de microdiluição foram identificadas com caneta marcadora multiuso (Comércio e Importação Sertic Ltda., São Paulo/SP, Brasil), envoltas com filme de PVC transparente (Prezunic Mercadoria de Consumo e Varejo Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil). Em seguida, foram incubadas a 37°C e a leitura realizada em 24 horas. O crescimento em cada poço foi determinado numa escala de turvação (score) que varia de 0 a 4, sendo a escala 0 ausência de crescimento, aquela que se apresenta sem turbidez (CIM bactericida) e 4, sem redução de

crescimento, quando comparado com o controle positivo. Determina-se como CIM bacteriostática, a concentração mais baixa da droga que promove ligeira turbidez do meio de cultura (escala 1) (CLSI, 2005).

2.3.4. Teste de difusão em Ágar

Os cimentos testados (quadro1) e o controle positivo (medicamento genérico amoxicilina (875mg) + clavulonato de potássio (125 mg) (EMS S/A Hortolândia/SP, Brasil) foram manipulados, na proporção de 0,14g de pó para 1 gota de água destilada estéril, em placa de vidro (Daufenbach, Dental Web, Porto Alegre/RS, Brasil) com auxílio de uma espátula metálica (Dentsply Maillefer, Rio de Janeiro/RJ, Brasil).

As cepas de *E. faecalis* (quadro 2) foram revitalizadas em caldo BHI (OXOID Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e incubados em estufa de cultivo microbiológico a 37° C por 24 horas. Após esse período, as colônias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5ml de salina estéril a 0,85% e homogeneizadas em agitador de vórtex durante 15 segundos. A densidade celular foi padronizada com o auxílio do cartão de Wickman (+/- 3.0), padronizando os inóculos de acordo com o tubo 3.0 da escala de Mc Farland (9×10^8 UFC/ml).

Para a execução do teste de difusão em ágar [39, 40] o meio de cultura ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA- SP LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil) foi distribuído em placas de Petri (20 x 140 mm de diâmetro), com volume suficiente para atingir 4mm de espessura. Após a solidificação, as suspensões bacterianas foram inoculadas, com auxílio de cotonetes estéreis (Johnson&Johnson, São José dos Campos/SP, Brasil). A técnica utilizada foi a semeadura de superfície, em três sentidos: horizontal, vertical e diagonal, para evitar o crescimento de colônias isoladas.

Em seguida, foram confeccionados cinco poços equidistantes, com 4mm de profundidade, no ágar Muller-Hinton contendo as inoculações bacterianas. Para tanto, foram utilizados canudos plásticos (Plascobril Sacolas Brilhante Ltda, Orleans/SC, Brasil), de forma a padronizar o diâmetro da perfuração. Os poços foram completamente preenchidos com os respectivos

cimentos espatulados, por meio de porta-amálgama plástico autoclavável virgem estéril (Maquira indústria de produtos odontológicos Ltda, Maringá/PR, Brasil).

Para padronização do teste, foi realizado o controle negativo (suspensão da cepa de *E. faecalis* em caldo Mueller-Hinton) e o controle positivo (medicamento genérico amoxicilina (875mg) + clavulonato de potássio (125 mg) diluído em água destilada). As placas foram identificadas com canetas marcadoras multiuso (Comércio e Importação Sertic Ltda., São Paulo/SP, Brasil) e incubadas em estufa de cultivo microbiológico a 37°C por 48h.

Os resultados foram obtidos através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor dos discos, por meio de paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo/SP, Brasil) e expressos em milímetros [41]. A primeira leitura foi realizada com 24 horas, sendo confirmada a leitura com 48 horas.

2.3.5. Análise do pH

Com auxílio de espátula, foram pesados 2,5g dos materiais-testes (quadro1) em balança (Engineering S.R.L., Monza/MB, Itália). Em seguida, foram depositados em frascos de vidro, nos quais foram adicionados 50ml de água destilada. Estes frascos foram vedados com papel alumínio (Instituto GBarbosa Ltda., Aracaju/SE, Brasil), armazenados em bandeja plástica contendo água destilada e incubados a 37°C por 15 dias.

A aferição do pH foi realizada imediatamente após a pesagem, e após 24h, 72h, 7dias e 15 dias, em 3 momentos diferentes, utilizando um pHmetro digital calibrado (pH Meter Pocket-sized, LOHAND, China). A cada aferição do pH, procedia-se com a substituição da água destilada da bandeja.

2.3.6. Análise estatística

Para análise estatística da radiopacidade e do pH foi utilizado o teste Shapiro-Wilk de normalidade, em vista disso foi utilizado a análise de variância ANOVA e teste Tukey a nível de significância de 5%.

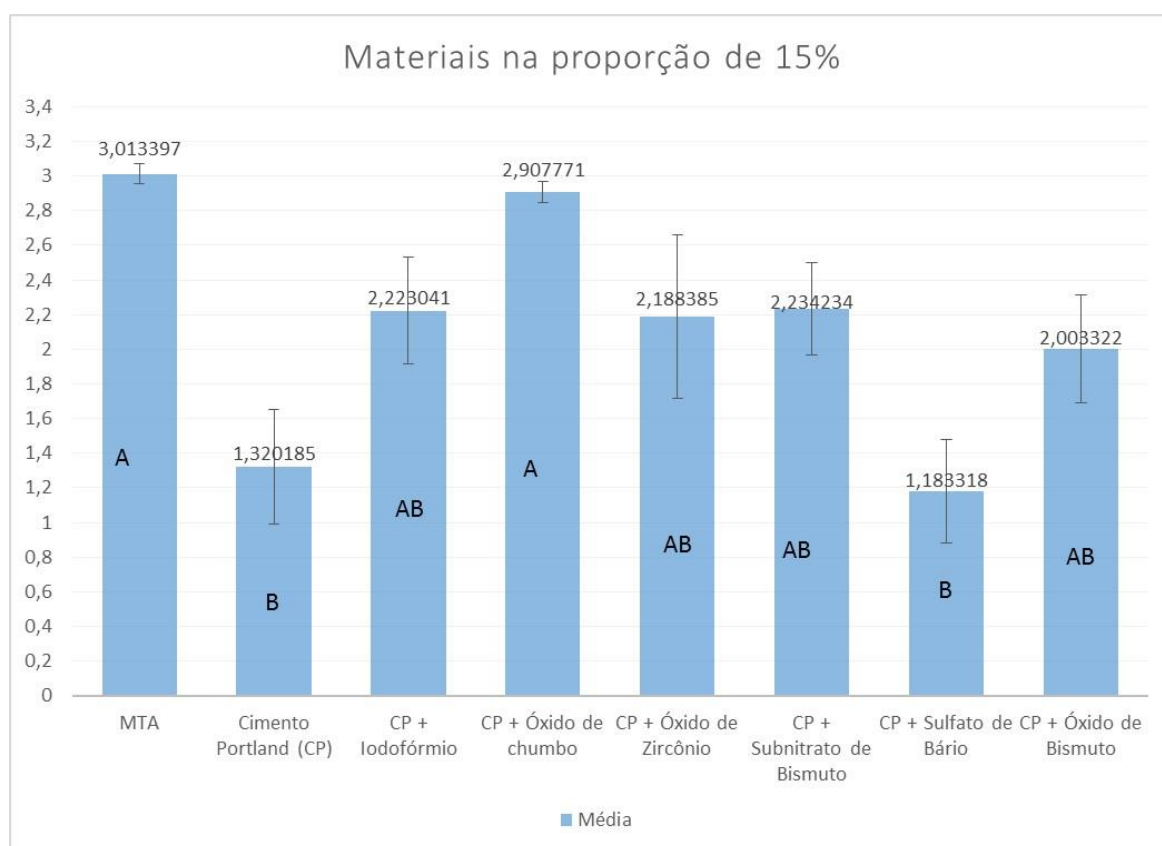
3. Resultados

De acordo com a metodologia empregada no presente trabalho de pesquisa, segue os resultados aplicando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey à nível de significância de 5% do MTA, cimento Portland puro e cimento Portland adicionado de radiopacificadores na proporção de 15%. (Tabela 1)

Tabela 1 – análise ANOVA para os materiais na proporção de 15%.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias dos quadrados	F	Valor de p
Entre grupos	13,198	7	1,885	7,288	0,001
Intra grupos	4,139	16	0,259		
Total	17,337	23			

Em vista da diferença estatística entre os grupos na análise de variância (ANOVA) foi aplicado ao teste Tukey à nível de significância de 5%, para comparar os diferentes materiais entre si, na proporção de 15%, letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 4).



*Letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

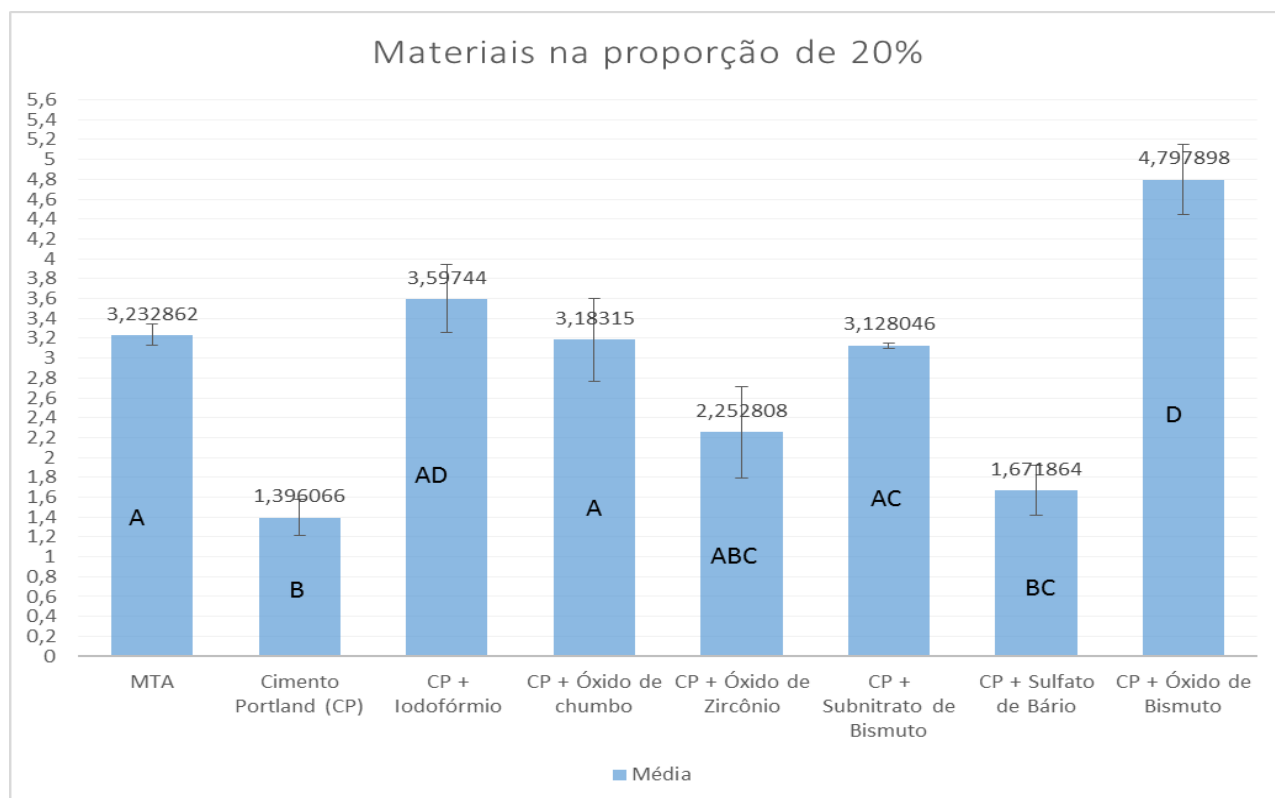
Figura 4 – Gráfico de médias e desvio-padrão dos materiais e radiopacificadores a 15% em mmEq/Al.

Na tabela 2, encontram-se os resultados aplicando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey à nível de significância de 5% do MTA, cimento Portland puro e cimento Portland adicionado de radiopacificadores na proporção de 20%.

Tabela 2 – análise ANOVA para os materiais na proporção de 20%.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias dos quadrados	F	Valor de p
Entre grupos	23,851	7	3,407	12,397	<0,001
Intra grupos	4,398	16	,275		
Total	28,249	23			

Em vista da diferença estatística entre os grupos na análise de variância (ANOVA) foi aplicado ao teste Tukey à nível de significância de 5%, para comparar os diferentes materiais entre si, na proporção de 20%, letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). (Figura 6).



*Letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

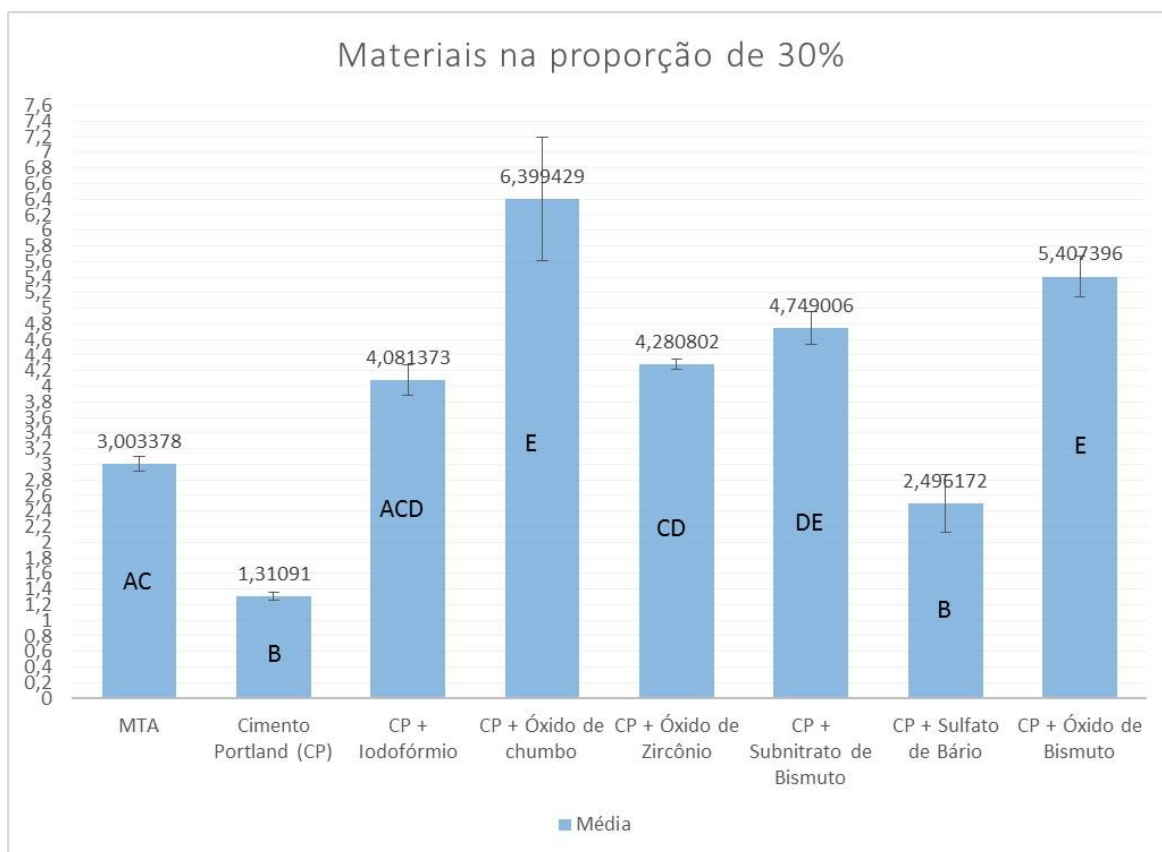
Figura 5 – Gráfico de médias e desvio-padrão dos materiais e radiopacificadores a 20% em mmEq/Al.

Na tabela 3, encontram-se os resultados aplicando a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey à nível de significância de 5% do MTA, cimento Portland e cimento Portland adicionado de radiopacificadores na proporção de 30%.

Tabela 3 – análise ANOVA para os materiais na proporção de 30%.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias dos quadrados	F	Valor de p
Entre grupos	56,584	7	8,083	22,979	<0,001
Intra grupos	5,628	16	0,352		
Total	62,212	23			

Em vista da diferença estatística entre os grupos na análise de variância (ANOVA) foi aplicado ao teste Tukey à nível de significância de 5%, para comparar os diferentes materiais entre si, na proporção de 30%, letras diferentes significa diferença estatística significativa ($p < 0,05$). (Figura 6).



*Letras diferentes significa diferença estatística significante ($p < 0,05$).

Figura 6 – Gráfico de médias e desvio-padrão dos materiais e radiopacificadores a 30% em mmEq/Al..

A tabela 4 contém os resultados do teste de difusão em ágar como valores dos halos inibitórios em milímetros (mm) do MTA, cimento Portland e cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores contra as cepas de *E. faecalis* testadas após os períodos de 24 e 48 horas.

Tabela 4 – TESTE DE SENSIBILIDADE: DIFUSÃO EM ÁGAR (HALOS INIBITÓRIOS) em milímetros (mm) do MTA, cimento Portland e cimento Portland adicionado de radiopacificadores após 24 e 48 horas.

Cimentos MTA, CP e Portland modificados	MICROORGANISMOS bactérias (<i>Enterococcus faecalis</i>)						
	CEPA Padrão	CEPAS CLÍNICAS					
	ATCC 29212	LMA26 8/B/1/5	LMA27 8/A/1/5	LMA28 8/A/1/4	LMA29 8/A/1/2	LMA31 8/C/1/2	LMA34 8/B/1/1

	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
CONTROLE POSITIVO*	29	29	40	40	33	35	34	35	30	30	40	44	40	45
CONTROLE NEGATIVO*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*														
MTA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CP (Cimento Portland puro)	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CP + Iodofórmio a 20%	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CP + Óxido de Chumbo a 20%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CP + Óxido de Zircônio a 30%	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0
CP + Subnitrato de Bismuto a 20%	0	0	0	30	0	10	0	0	0	0	0	23	0	0
CP + Óxido de Bismuto a 20%	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Antibiótico (amoxicilina + ácido clavulânico) + água destilada **Caldo Muller-Hinton + bactéria testada.

A tabela 5 contém os valores da menor concentração inibitória (MIC) em µg/ml do MTA, Cimento Portland e cimento Portland adicionado de radiopacificadores.

Tabela 5 – Menor Concentração inibitória mínima (MIC) em µg/ml do MTA, Cimento Portland e cimento Portland adicionado de radiopacificadores.

Cimentos MTA, Portland e Portland modificados	MICROORGANISMOS bactérias (<i>Enterococcus faecalis</i>)						
	CEPA Padrão	CEPAS CLÍNICAS					
	ATCC 29212	LMA26 8/B/1/5	LMA27 8/A/1/5	LMA28 8/A/1/4	LMA29 8/A/1/2	LMA31 8/C/1/2	LMA34 8/B/1/1
MTA	**0.625	*10	*5	*160	*20	**1.25	**80
CP (Cimento Portland puro)	**5	**2.5	**5	**10	**5	**5	*5
CP + Iodofórmio a 20%	*2.5	*80	*80	*2.5	*80	*160	*160
CP + Óxido de Chumbo a 20%	Não inibiu	**5	**20	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
CP + Óxido de Zircônio a 30%	**20	**10	**5	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu
CP + Subnitrato de Bismuto a 20%	*1.25	*1.25	**5	*1.25	*80	*5	**80
CP + Óxido de Bismuto a 20%	*20	*10	*10	Não inibiu	*160	*1.25	Não inibiu

*Bactericida

**Bacteriostático

A tabela 6 contém os valores médios de pH, análise de variância (ANOVA) e Tukey ao nível de significância de 5%. Diferenças significativas na mesma linha são representadas por letras diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabela 6 –Valores médios de pH, análise de variância (ANOVA) e Tukey ao nível de significância de 5%.

	MTA	CP puro	CP + Iodofórmio 20%	CP + óxido de chumbo 20%	CP + óxido de zircônio 30%	CP + subnitrato de bismuto a 20%	CP + óxido de bismuto a 20%
Imediato	11 ^a	10,9 ^a	11,04 ^a	11,1 ^a	11,27 ^a	10,74 ^a	11,23 ^a
24 horas	10 ^a	11b	11,2c	11,2c	11,2c	10,8b	11,2 ^a
72horas	9 ^a	11,43b	11,4b	11,3c	11,3c	11d	11,4b
7 dias	9 ^a	11,33b	11,3b	11,3b	11,27b	11c	11,3b
15 dias	9 ^a	11,27bc	11,3c	11,13d	11,2bd	10,7e	11,2bd

*Diferenças significativas na mesma linha são representadas por letras diferentes (p≤0,05).

4. Discussão

O desenvolvimento de cimentos endodônticos retrobturadores torna-se uma alternativa viável para a preservação do dente como uma unidade funcional [10]. Tais cimentos devem promover selamento, biocompatibilidade, insolubilidade ou baixa solubilidade, resistência à compressão, estabilidade dimensional, radiopacidade, alcalinidade, potencial bioativo e atividade antimicrobiana [20]. Portanto, devem fornecer vedação hermética e serem precursores para a formação de carbonato-apatita, que promove a mineralização dentária [10].

As características de radiopacidade são imprescindíveis nos cimentos endodônticos, por favorecer a visualização e a interpretação radiográfica, bem como a diferenciação das estruturas dentais e anatômicas adjacentes [11, 20, 21]. Os cimentos endodônticos obturadores e retrobturadores devem ter radiopacidade mínima de 3 mmEq.Al, conforme a especificação n° 57 da ANSI/ADA (2000) [20].

Dentre as infecções endodônticas persistentes, destacam-se as infecções pulpar e periapicais pós-tratamento, nas quais predominam bactérias entéricas resistentes [27]. O *Enterococcus faecalis* é o microorganismo mais comumente isolado, sobretudo em casos de

insucessos dos tratamentos convencionais, quando o retratamento é instituído [10, 14, 28, 29, 30]. Apesar de sobreviver em pH alcalino, ainda não foi determinado o pH exato para a sua eliminação [24].

A resistência e patogenicidade do *E. faecalis* elegem-no indicador biológico em várias pesquisas *in vitro*, parâmetro de avaliação da efetividade dos procedimentos microbiológicos, especificamente, a eficácia antimicrobiana de cimentos obturadores e retrobturadores [27, 28, 29]. No presente estudo, foram testadas 7 cepas bacterianas de *E. faecalis*, sendo uma padrão (ATCC 29212) e seis clínicas: LMA 26, LMA 27, LMA 28, LMA 29, LMA 31 e LMA 34 pertencentes à coleção de culturas do LMA/DMO/UFS.

Os cimentos endodônticos MTA e CP apresentam propriedades antimicrobianas, mecânicas, físico-químicas e respostas biológicas similares, tais como biocompatibilidade, capacidade seladora e indução à remineralização óssea [11, 12, 14, 15, 23, 31, 32, 33]. Todavia, o radiopacificador óxido de bismuto, 20% em peso, confere radiopacidade adequada ao MTA [11, 23, 24, 42], aproximadamente 5,72 mmEq.Al [43], 4,90 mmEq.Al [11], e 7,52 mmEq.Al [8]. No presente estudo, o MTA apresentou 3,59 mmEq.Al de radiopacidade. Pesquisadores [8, 44] concluíram que o MTA contém 20% de óxido de bismuto, 75% de CP e 5% de sulfato de cálcio desidratado, como modificador de configuração.

A radiopacidade do CP é significativamente inferior à dentina [45]. Insuficiente para diferenciá-lo dos tecidos dentais e osso alveolar, limitando a visualização radiográfica após inserção no canal radicular, prejudicando a avaliação dos tratamentos de retrobturação [12, 16, 20]. Em diversas pesquisas, apresentou valores de radiopacidade entre 0,86 - 2,02 mmEq.Al [11, 12, 16, 20, 23, 43, 44, 46, 47]. No presente estudo, o CP apresentou os menores valores de radiopacidade, cerca de 1,3 mmEq.Al. Estudos sugerem a sua utilização na prática clínica [10, 15]. Portanto, a agregação de agentes radiopacificadores e novos testes tornam-se relevantes.

O bismuto (Bi) vem sendo apresentado como um elemento com excelente propriedade radiopacizante [11]. O óxido de bismuto proporcionou 5,88 mmEq.Al de radiopacidade ao CP [43]. Nas proporções 10, 15, 20, 25 e 30%, promoveu radiopacidade superior a 3 mmEq.Al [33, 47]. A adição de 30%, elevou a radiopacidade do CP para 9,79 mmEq.Al [48, 49]. Pesquisas confirmaram que 20% do óxido de bismuto adicionado a 80% do CP proporcionou 3,00 mmEq.Al [43, 50, 51]. No presente trabalho, promoveu 4,79 mmEq.Al de radiopacidade.

Apesar da excelente radiopacidade, constatou-se que o óxido de bismuto prejudica as propriedades mecânicas dos materiais dentários e provoca genotoxicidade em culturas de células de mamíferos, sendo nocivo do ponto de vista biológico [52], além de reagir com o colágeno, principal constituinte da dentina, tornando-a acinzentada [8]. O manchamento dentinário e, consequente descoloração dos dentes, desperta grande preocupação na prática clínica, uma vez que podem afetar negativamente a estética dos dentes anteriores dos pacientes, sugerindo a utilização de um radiopacificador alternativo em formulações do MTA [8].

A adição de diferentes proporções de óxido de bismuto ao CP não compromete a resistência do material quando comparado com o CP puro [35, 52]. Entretanto, constatou-se que, a longo prazo, tal radiopacificador pode causar alterações nas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas do MTA e CP, resultando no aumento da porosidade com resistência e longevidade diminuídas [10, 11, 20, 22, 47, 49, 51].

Como a radiopacidade do CP está condicionada aos agentes radiopacificadores, a investigação de novas substâncias radiopatzantes, alternativas ao óxido de bismuto, torna-se relevante [11, 22, 23, 24]. Embora o CP seja biocompatível, diferentes formulações podem modificar suas propriedades [20]. Assim sendo, o radiopacificador adicionado ao CP não deve interferir negativamente em propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas importantes, tais como a liberação de íons cálcio e pH alcalino, relacionadas à mineralização e ação antimicrobiana. Diversos radiopacificadores alternativos ao óxido de bismuto foram adicionados ao CP com o intuito de proporcionar radiopacidade adequada. Dentre eles, têm-se o subnitrato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, óxido de chumbo e óxido de zircônio, os quais promoveram radiopacidade superior à da dentina e do CP puro [23, 25].

No presente estudo, a adição de 20% de subnitrato de bismuto a 80% do CP promoveu 3,12 mmEq.Al de radiopacidade, corroborando com pesquisas [48, 52], nas quais foram observados 3,00 mmEq.Al. Embora os resultados sejam promissores em termos de radiopacidade, algumas dúvidas permanecem em relação às propriedades físico-mecânicas e compatibilidade biológica. Outras substâncias com menor citotoxicidade poderiam ser testadas com o mesmo propósito.

Pesquisadores [22, 50] concluíram que 20% do óxido de chumbo adicionado a 80% do CP, confere radiopacidade suficiente, podendo ser considerado radiopacificador alternativo. No

presente trabalho, o CP adicionado do óxido de chumbo e do iodofórmio, na proporção de 20%, promoveu 3,18 mmEq.Al e 3,59 mmEq.Al de radiopacidade, respectivamente.

O CP, adicionado de 20% do sulfato de bário, obteve cerca 2,80 mmEq.Al de radiopacidade [46, 48]. Todavia, outros estudos concluíram que o sulfato de bário, nesta proporção, promove radiopacidade satisfatória ao CP [44]. No presente estudo, a associação de 70% do CP a 30% do sulfato de bário atingiu 2,49 mmEq.Al de radiopacidade, inferior à norma nº 57 da ANSI/ADA (2000). A porcentagem da adição do agente radiopacificador aos cimentos endodônticos não pode exceder 30% porque altera sensivelmente as propriedades do material [48]. Este fato limita o uso deste agente radiopacificador.

O óxido de zircônio tem sido identificado como radiopacificador alternativo do CP [20, 53]. A incorporação de diferentes concentrações de óxido de zircônio ao CP proporcionou radiopacidade similar ao MTA [11], cerca de 3,87 mmEq.Al [43]. O RetroMTA® (BioMTA, Coreia do Sul), foi recentemente introduzido no mercado, com indicações endodônticas semelhantes ao MTA. Porém, o óxido de zircônio substituiu o óxido de bismuto, beneficiando a estética e prevenindo a descoloração [8]. Apresenta $4,07 \pm 0,20$ mmEq.Al de radiopacidade. Todavia, o ProRoot® MTA mostrou valores significativamente mais elevados de radiopacidade ($7,52 \pm 0,15$ mmEq.Al) ($p < 0,001$). Na presente pesquisa, 70% do CP associado a 30% do óxido de zircônio atingiu 4,28 mmEq.Al de radiopacidade; Sob as formas micro e nanoparticuladas, nas mesmas proporções, promoveu 3,50 mmEq.Al e 4,19 mmEq.Al de radiopacidade [11]; adequada conforme a especificação nº 57 da ANSI/ADA (2000) [20].

No teste de microdiluição do presente estudo, o MTA apresentou atividade bacteriostática contra a cepa padrão (ATCC 29212) e cepas clínicas de LMA 31 e LMA 34; e bactericida contra as demais cepas de *E. faecalis* testadas, corroborando com Sipert *et al.*, (2005) [54], os quais afirmaram que o MTA exerce atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*. O CP puro apresentou atividade bactericida contra a cepa LMA 34 e bacteriostática contra as demais cepas testadas. O CP adicionado do óxido de chumbo a 20%, exerceu atividade bacteriostática contra as cepas LMA 26 e 27; mas não inibiu as demais cepas testadas. O CP adicionado de zircônio a 30% exerceu atividade bacteriostática contra a cepa padrão ATCC (29212) e clínicas LMA 26 e LMA 27 e não inibiu as demais cepas testadas. O CP adicionado do óxido de bismuto a 20% não inibiu as cepas clínicas LMA 28 e LMA 34; porém exerceu atividade bactericida contra as demais cepas testadas. O CP + óxido de bismuto a 20% exerceu atividade bacteriostática contra as cepas LMA 27 e LMA 34; e atividade bactericida contra as demais

cepas testadas. O CP adicionado do iodofórmio a 20% exerceu atividade bactericida contra todas as cepas de *E. faecalis* testadas. Na literatura não foram encontrados artigos contendo teste de microdiluição (MIC) dos cimentos endodônticos MTA, CP puro e CP adicionado de agentes radiopacificadores supracitados contra as cepas de *E. faecalis* testadas na presente pesquisa.

Em casos de testes de microdiluição de óleos extraídos de produtos naturais, padroniza-se a média entre os valores para a obtenção da MIC. No presente estudo, os testes de microdiluição foram realizados em duplicata e o menor resultado encontrado nas duas placas foi eleito como a concentração inibitória mínima (MIC), devido ao fato dos materiais-testes serem produtos químicos.

No teste de difusão em ágar do presente estudo, o MTA e o CP adicionado do óxido de chumbo a 20% não inibiram as cepas de *E. faecalis* testadas. A cepa LMA 26 foi inibida com halos de 15 mm, 17 mm, 28 mm, 30 mm e 22 mm pelo CP puro, CP adicionado a 20% dos radiopacificadores iodofórmio, óxido de bismuto, subnitrato de bismuto; e pelo CP adicionado de 30% do óxido de zircônio, respectivamente. A cepa LMA 31 foi inibida com halos de 23 mm pelo CP adicionado dos radiopacificadores subnitrato de bismuto a 20% e óxido de zircônio a 30%, respectivamente. A cepa LMA 27 foi inibida com halo de 10 mm pelo CP adicionado do subnitrato de bismuto a 20%. Todos estes resultados foram mensurados após de 48 horas de incubação. De forma similar, Miyagak *et al.*, 2006 [55] observaram que o MTA e CP puro não inibiram as cepas de *E. faecalis* testadas por meio deste teste.

A cepa padrão (ATCC 29212) não foi inibida pelos materiais-testes no teste de difusão em ágar do presente trabalho. Porém, estudos constataram que o MTA promoveu halos inibitórios de 12,17 mm [11] e o CP puro proporcionou halos inibitórios de 9,0 mm [35], 10,67 mm [11] e 5 mm [56] contra a cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212), corroborando com estudos que afirmaram que o CP apresenta atividade antimicrobiana [42]. O CP adicionado do óxido de bismuto e de 30% de óxido de zircônio, proporcionaram halos inibitórios de 8.0 mm [35] e 8.0 mm [25] contra a cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212). Sob as formas micro e nanoparticuladas, o óxido de zircônio, nas mesmas proporções, promove atividade antimicrobiana [20]; Foram observados halos inibitórios com valores de 10,50 mm e 10,90 mm contra a cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) [11].

O método de difusão em ágar tem limitações para substâncias com baixa difusibilidade no meio cultura. No presente estudo, os cimentos testados não inibiram e/ou proporcionaram

halos com baixos valores de inibição contra as cepas de *E. faecalis*, em comparação com os resultados apresentados no teste de microdiluição. Todavia, no controle positivo, o antibiótico genérico amoxicilina (875 mg) + ácido clavulânico (125 mg) adicionado à água destilada proporcionou halos inibitórios com valores médios entre 29 a 45 mm. Este fato põe em questão se a ausência e/ou baixos valores dos halos inibitórios foram provocados pela impregnação do pó no ágar Muller-Hinton, tornando-o opaco, dificultando ou impossibilitando a visualização e mensuração de tais halos, os quais são translúcidos. Mais estudos são necessários para elucidar a possibilidade deste viés.

No presente estudo, todos os materiais-testes alcalinizaram o meio em todos os períodos experimentais. O MTA apresentou os menores valores de pH, equivalentes a 8,0-11,0. Embora alcalino, são inferiores aos dados fornecidos pelos fabricantes, corroborando com resultados de pesquisadores que constataram pH com valores entre 9,97 [47] e 9,93-8,0 [8] no MTA. Conforme Souza *et al.*, (2015) [8], os níveis de pH inferiores às especificações dos fabricantes, pode ser explicado pelas diferentes abordagens metodológicas. Segundo pesquisas, a hidratação do MTA libera hidróxido de cálcio e alcaliniza o meio [42], possibilitando a reparação [23, 36]. Em diversos estudos, o MTA alcalinizou o meio com valores de pH: 12,5 [20]; 12,0 [9, 56], e 9,21-10,74 [11].

Segundo estudos, o CP puro alcalinizou o meio, com valores médios de pH entre 10,22-10,24 [35]; 7,88-10,1 [11], corroborando com achados de Borges *et al.*, 2010 [60]; no presente estudo, foram constatados valores de pH entre 10,9 e 11,43. O CP adicionado de 20% do óxido de bismuto proporcionou pH entre 10,21-10,28 [45]; no presente estudo, apresentou valores médios de pH entre 11,20-11,40. No presente estudo, o iodofórmio, na proporção de 20%, adicionado a 80% do CP, alcalinizou o meio com pH entre 11,04-11,40.

Estudos concluíram que a hidratação do CP acrescido de 30% de óxido de zircônio, favorece o cimento, pois proporciona liberação de íons cálcio, eleva o pH e o potencial bioativo [11, 23, 35, 55]. Na presente pesquisa, 70% do CP associado a 30% do óxido de zircônio atingiu pH entre 11,20-11,30, corroborando com pesquisadores afirmaram a associação do óxido de zircônio ao alcalinização do meio, com valores médios entre 10,20-10,22 [35]. Sob as formas micro e nanoparticuladas, o óxido de zircônio, nas mesmas proporções, promove alcalinização [20] com valores de pH entre 7,80-10,15 e 7,73-9,89 [11]. O RetroMTA® apresentou pH entre 9,93-7,9 e biocompatibilidade semelhantes ao ProRoot® MTA. Todavia, no ProRoot® MTA o

pH variou de 9,93 a 8,9, sem diferenças significativas ao longo dos períodos experimentais ($p>0,05$) [8].

No presente estudo, os valores médios de pH obtidos no CP variou entre 10,9 e 11,43. Estes valores não apresentam diferença estatisticamente significativa em comparação com os valores médios de pH proporcionados pela adição dos agentes radiopacificadores ao CP, em diferentes proporções, também constatados neste estudo (10,7-11,43). Tais resultados sugerem que a adição de agentes radiopacificadores ao CP não alterou significativamente seus valores de pH e, conseqüentemente, a alcalinidade do meio. Novos testes tornam-se necessários para melhor avaliação deste fato.

Antes de qualquer material odontológico ser empregado em seres humanos, deve ser submetido a vários estudos, a fim de demonstrar que pode ser aplicado de uma maneira segura e eficiente [46]. As conclusões obtidas por um estudo *in vitro* são limitadas, porém, necessárias para obtenção de um vasto conhecimento sobre todas as propriedades dos materiais, permitindo que os mesmos sejam testados *in vivo* e, a partir daí, utilizados na clínica diária [57]. As metodologias utilizadas neste estudo foram modelos *in vitro*, reproduzidas para avaliar a radiopacidade, pH e as propriedades antimicrobianas dos cimentos testados.

A biocompatibilidade é extremamente necessária nos cimentos retrobturadores, uma vez que a toxicidade pode promover degeneração dos tecidos periapicais e atraso no reparo. Segundo pesquisas, o CP e MTA não são genotóxicos [36], e apresentaram biocompatibilidade semelhante [58]. No entanto, existem poucos relatos sobre a biocompatibilidade do CP acrescido de agentes radiopacificadores. Estudos adicionais devem ser conduzidos para avaliar a resposta histológica em subcutâneo de rato, bem como a capacidade seladora dos cimentos experimentais. Para tanto, de acordo com a metodologia do presente manuscrito o MTA e as concentrações de CP adicionado de 20% do agente radiopacificador subnitrato de bismuto e CP adicionado do agente radiopacificador iodofórmio, 20% em peso, são as indicadas, pois proporcionaram radiopacidade satisfatória, alcalinizaram o meio e promoveram atividades bactericida e bacteriostática contra as cepas de *E.faecalis* testadas, portanto, sendo sugeridos como materiais para estudo da biocompatibilidade.

Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir no desenvolvimento de um novo material para ser utilizado como cimento retrobturador com propriedades adequadas à prática clínica. O uso clínico de CP adicionado de agente radiopacificador seria uma alternativa a MTA

em procedimentos retrobturadores. O CP tem um menor custo e é prontamente disponível, que são fatores importantes nos países em desenvolvimento [10].

Este novo material pode ser visto como uma estratégia para resolver questões de impacto social e pode proporcionar meios viáveis para minimizar a perda frequente de dentes que ocorrem, especialmente no sistema público de saúde [10]. Desta forma, tratamentos endodônticos complexos podem ser mais acessíveis aos pacientes com menor poder aquisitivo.

5. Conclusões

O MTA e a concentração de CP adicionado de 20% do agente radiopacificador subnitrito de bismuto proporcionaram radiopacidade satisfatória, alcalinizaram o meio e promoveram atividade bacteriostática contra as cepas de *E.faecalis* testadas. O CP adicionado de 20% do iodofórmio apresentou radiopacidade adequada, alcalinidade e atividade bactericida contra todas as cepas de *E. faecalis* testadas, demosntrando maior eficácia.

Referências

- [1] Bouschlicher MR, Cobb DS, Boyer DB. Radiopacity of compomers, flowable and conventional resin composites for posterior restarations. Oper Dent. 1999 Jan-Feb; 24 (1): 20-25.
- [2] Akerboom HB, Kreulen CM, Van Amerongen WE, Mol A. Radiopacity of posterior composite resins, composite resin luting cements, and glass ionomer lining cements. J Prosthet Dent. 1993 Oct; 70 (4): 351- 5.
- [3] Gu S, Rasimick BJ, Deutsch AS, Musikant BL. Radiopacity of dental materials using a digital X-ray system. Dent Mater. 2006 Aug; 22 (8): 765-770.
- [4] Curtis PM Jr, von Fraunhofer JA, Farman AG. The radiographic density of composite restorative resins. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990 Aug; 70 (2): 226-230.

- [5] Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993 Nov; 19 (11): 541-4.
- [6] Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999 Mar; 25 (3): 197-205.
- [7] Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review - Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010 Mar; 36 (3): 400-13.
- [8] Souza LC, Yadlapati M, Dorn SO, Silva R, Letra A. Analysis of radiopacity, pH and cytotoxicity of a new bioceramic material. *J Appl Oral Sci* 2015 Jul-Aug; 23(4):383-9.
- [9] Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review - Part II: Leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010 Feb; 36 (2): 190-202.
- [10] da Silva SR, da Silva Neto JD, Veiga DF, Schnaider TB, Ferreira LM. Portland cement versus MTA as a root-end filling material. A pilot study. *Acta Cir Bras.* 2015 Feb; 30(2): 160-4.
- [11] Guerreiro-Tanomaro JM, Storto I, Da Silva GF, Bosso R, Costa BC, Bernardi MI, et al. Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J.* 2014 Apr; 33 (4): 460-70.
- [12] Martínez-Lalis R, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2009; 20 (2): 112-7.
- [13] Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18 (1): 3-7.
- [14] Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod.* 2006 Mar; 32(3): 193-7.

- [15] Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. J Endod. 2009 Feb; 35 (2): 243-50.
- [16] Bidar M, Moradi S, Jafarzadeh H, Bidad S. Comparative SEM study of the marginal adaptation of white and grey MTA and Portland cement. Aust Endod J. 2007 Apr; 33 (1): 2-6.
- [17] Valera MC, Camargo CH, Carvalho AS, Gama ER. In vitro evaluation of apical microleakage using different root-end filling materials. J Appl Oral Sci. 2006 Jan; 14 (1): 49-52.
- [18] Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. Int Endod J. 2005 Nov; 38 (11): 834-42.
- [19] New American Dental Association specification N° 27 for direct filling resins. Council on Dental Materials and Devices. J Am Dent Assoc. 1977 Jun; 94 (6): 1191-4.
- [20] Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. Clin Oral Investig. 2016 Jan; 20 (1): 83-90.
- [21] Takeshita WM, Vessoni Iwaki LC, Da Silva MC, Filho LI, Queiroz Ade F, Geron LB. Comparison of the diagnostic accuracy of direct digital radiography system, filtered images, and subtraction radiography. Contemp Clin Dent. 2013 Jul; 4 (3): 338-342.
- [22] Chen C *et al.* Radiopacy and cytotoxicity of Portland cement containing zirconia doped bismuth oxide radiopacifiers. J Endod. 2014; 40 (2): 251-4.
- [23] Hungaro Duarte MA *et al.* Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. J Endod. 2012; 38 (3): 394-7.

- [24] Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2014 Nov-Dec; 22(6): 554-9.
- [25] Ergücü Z, Türkün LS, Onem E, Güneri P. Comparative radiopacity of six flowable resin composites. *Oper Dent.* 2010 Jul-Aug; 35 (4): 436-440.
- [26] New American Dental Association. The desirability of using radiopaque plastics in dentistry: a status report. Council on Dental Materials, Instruments and Equipment. *J Am Dent Assoc.* 1981 Mar; 102(3): 347-9.
- [27] Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan; 36(1):1-11.
- [28] Alves DR, Cunha RS, Bueno CE, Alencar AH, Estrela CR, Santos TO *et al.* Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Contem Dent Pract* 2015 May 1; 16(5): 340-6.
- [29] Nacif MCAM, Alves FRF. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. *Rev. Bras. Odontol.* 2010 Jul-Dez; 67 (2): 209-14.
- [30] Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2007; 36(2): 163-68.
- [31] Bayram HM, Saklar F, Bayram E, Orucoglu H, Bozkurt A. Determination of the Apical Sealing Abilities of Mineral Trioxide Aggregate, Portland Cement, and Bioaggregate After Irrigation with Different Solutions. *J Int Oral Health.* 2015 Jun; 7(6): 13-7.
- [32] Gonçalves JL, Viapiana R, Miranada CES, Borges AH, Cruz Filho AM. Evaluation of physico-chemical properties of Portland cements and MTA. *Braz Oral Res.* 2010 Jul-Sep; 24(3): 277-83.

- [33] Hwang YC et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol J. Endod.* 2009; 107 (3): 96-102.
- [34] Hasan Zarrabi M, Javidi M, Naderinasab M, Gharechahi M. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. *J Oral Sci.* 2009; 51 (3): 437-42.
- [35] Guerreiro-Tanomaro JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012 Oct; Article ID 469019: 5 pages.
- [36] Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *J Endod.* 2010; 43 (3): 231-40.
- [37] Tanomaru-Filho M, Garcia AC, Bosso-Martelo R, Berbert FL, Nunes Reis JM, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of addition of calcium oxide on physicochemical properties of Portland cement with zirconium or niobium oxide. *J Conserv Dent.* 2015 Mar-Apr; 18(2): 105-8.
- [38] Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobuti NR, Sinto SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica.* São Paulo: Sarvier; 2000.
- [39] Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.* 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2003. p. 325.
- [40] Ostrosky EA, Myzumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008 Abr-Jun; 18 (2): 301-7.
- [41] de Carvalho PM Jr, Rodrigues RF, Sawaya AC, Marques MO, Shimizu MT. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *J Ethnopharmacol.* 2004 Dec; 95 (2-3): 297-301.

- [42] Borges AH, Pedro FL, Miranda CE, Semenoff-Segundo A, Pécora JD, Filho AM. Comparative study of physico-chemical properties of MTA-based and Portland cements. *Acta Odontol Latinoam*. 2010; (3): 175-81.
- [43] Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, Duarte A. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108 (4):628-32.
- [44] Saliba E, Baixa-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *J Endod*. 2009; 42(4): 322-8.
- [45] Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cement and Portland cement. *J Oral Sci* 2007; 49 (1): 41-5.
- [46] Bortoluzzi EA, Broon JN, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod*. 2009; 35 (4): 550-4.
- [47] Bueno CE, Zeferino EG, Manhães LR Jr, Rocha DG, Cunha RS, De Martins AS. Study of the bismuth oxide concentration required to provide Portland cement with adequate radiopacity for endodontic use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107 (1): 65-9.
- [48] Vivan RR et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental rootend filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108 (6): 35-8.
- [49] Camilleri J, Cutajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater*. 2011; 27 (8): 845-54.
- [50] Hungaro Duarte MA et al. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35 (5): 737-40.

- [51] Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105 (1): 54-7.
- [52] Coleman NJ e Li Q. The impact of zirconium oxide radiopacifier on the early hydration behaviour of white Portland cement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013; 33 (1): 427-33.
- [53] Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int. Endod. J.* 2005; 38 (8): 539-43.
- [54] Miyagak CD, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res.* 2006; 20 (4): 303-6.
- [55] Mazurek C, Sassone LM, Andrade AO, Murad CF, Fidel RAS, Hirata-Júnior R. Atividade antimicrobiana de materiais reparadores de uso endodôntico pelos testes de difusão em ágar e por contato direto. *Rev. bras. odontol.* 2012 Jan-Jun; 69 (1): 25-9.
- [56] Borges AH, Orçati Dorileo MC, Dalla Vila R, Borba AM, Semenoff TA, Guedes AO et al. Physicochemical properties and surfaces morphologies evaluation of MTA FillApex and AH Plus. *Scientific World Journal (on line)* 2014 May 4; 2014: Article ID 589732: 6 pages.
- [57] Mangala MG, Sharath Chandra SM, Bhayle RM. To evaluate the biocompatibility of the Indian Portland cement with for potential use in dentistry: An animal study. *Journal of Conservative Dentistry* 2015; 18(7): 440-4.
- [58] Vivan RR et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110 (2): 250-6.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- O MTA apresentou atividades bactericida e bacteriostática contra as cepas testadas e níveis de radiopacidade e de pH, de acordo com a normativa da ISO e especificação nº 57 da ANSI/ADA (2000);
- O CP puro alcalinizou o meio e proporcionou atividades bactericida e bacteriostática contra as cepas bacterianas testadas, apesar da baixa radiopacidade em relação à normativa da ISO e especificação nº 57 da ANSI/ADA (2000);

- O CP adicionado do radiopacificador óxido bismuto, 20% em peso, alcalinizou o meio, proporcionou adequada radiopacidade e atividade bactericida contra a maioria das cepas bacterianas; porém não inibiu algumas cepas de *E. faecalis* testadas.
- O CP associado aos radiopacificadores óxido de chumbo e óxido de zircônio, nas proporções de 20 e 30%, respectivamente, apresentaram adequada radiopacidade e alcalinizaram o meio. Porém, apresentaram atividade bacteriostática contra algumas cepas e não inibiram as demais cepas de *E. faecalis* testadas.
- O CP adicionado de 20% do agente radiopacificador subnitrato de bismuto proporcionou radiopacidade satisfatória, alcalinizou o meio e promoveu atividades bactericida e bacteriostática contra as cepas de *E. faecalis* testadas;
- O CP adicionado do agente radiopacificador iodofórmio, 20% em peso, proporcionou radiopacidade satisfatória, alcalinização do meio e atividade bactericida contra todas as cepas de *E. faecalis* testadas.

6. COMUNICADO DE IMPRENSA (*PRESS RELEASE*):

O cimento Portland (Votorantin), utilizado em construção civil, em sua versão modificada em laboratório, possivelmente substituirá o Mineral Trióxido Agregado (MTA), material odontológico usado em tratamentos endodônticos complexos, dizem pesquisadores.

Pesquisadores da área de odontologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS – Divulgaram resultado de pesquisa, na qual foi observado que o cimento Portland (Votorantin) usado em construção civil, acrescido de substâncias que promovem a melhoria das suas propriedades, poderá substituir o MTA, que é um material odontológico de alto custo, utilizado

em tratamentos complexos de canais. Novos testes deverão realizados para liberação do cimento Portland para a prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. American National Standards Institute, American Dental Association. ANSI/ADA Specification N° 57: Endodontic sealing material. Chicago: ANSI/ADA; 2000.
2. Alves DR, Cunha RS, Bueno CE, Alencar AH, Estrela CR, Santos TO *et al.* Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. J Contem Dent Pract 2015 May 1; 16(5): 340-6.
3. Akerboom HB, Kreulen CM, Van Amerongen WE, Mol A. Radiopacity of posterior composite resins, composite resin luting cements, and glass ionomer lining cements. J Prosthet Dent. 1993 Oct; 70 (4): 351- 5.

4. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod.* 2009 Feb; 35 (2): 243-50.
5. Bayram HM, Saklar F, Bayram E, Orucoglu H, Bozkurt A. Determination of the Apical Sealing Abilities of Mineral Trioxide Aggregate, Portland Cement, and Bioaggregate After Irrigation with Different Solutions. *J Int Oral Health.* 2015 Jun; 7(6):13-7.
6. Bidar M, Moradi S, Jafarzadeh H, Bidad S. Comparative SEM study of the marginal adaptation of white and grey MTA and Portland cement. *Aust Endod J.* 2007 Apr; 33 (1): 2-6.
7. Bodanezi A, Bortoluzzi EA, Munhoz EA, Bernardineli N, De Moraes IG, Bramante CM. Radiopacidade do cimento Portland adicionado de agentes radiopacificadores em diferentes proporções. *Rev Inst Ciênc Saúde* 2009 Abr-Jun; 27 (2): 167-70.
8. Borges AH, Orçati Dorileo MC, Dalla Vila R, Borba AM, Semenoff TA, Guedes AO et al. Physicochemical properties and surfaces morphologies evaluation of MTA FillApex and AH Plus. *ScientificWorldJournal* (on line) 2014 May 4; 2014: Article ID 589732: 6 pages.
9. Borges AH, Pedro FL, Miranda CE, Semenoff-Segundo A, Pécora JD, Filho AM. Comparative study of physico-chemical properties of MTA-based and Portland cements. *Acta Odontol Latinoam.* 2010; (3): 175-81.
10. Bortoluzzi EA, Broon JN, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod.* 2009; 35 (4): 550-4.
11. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, Duarte A. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108 (4):628-32.
12. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig.* 2016 Jan; 20 (1): 83-90.

13. Bouschlicher MR, Cobb DS, Boyer DB. Radiopacity of compomers, flowable and conventional resin composites for posterior restorations. *Oper Dent*. 1999 Jan-Feb; 24 (1): 20-25.
14. Bueno CE, Zeferino EG, Manhães LR Jr, Rocha DG, Cunha RS, De Martins AS. Study of the bismuth oxide concentration required to provide Portland cement with adequate radiopacity for endodontic use. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107 (1): 65-9.
15. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *J Endod*. 2010; 43 (3): 231-40.
16. Camilleri J, Cutajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater*. 2011; 27 (8): 845-54.
17. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J*. 2005 Nov; 38 (11): 834-42.
18. Chen C *et al*. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement containing zirconia doped bismuth oxide radiopacifiers. *J Endod*. 2014; 40 (2): 251-4.
19. Coleman NJ e Li Q. The impact of zirconium oxide radiopacifier on the early hydration behaviour of white Portland cement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013; 33 (1): 427-33.
20. Costa BC, Campos CN, Duarte MAH, Chaves MGAM, Grizzo LT, Tanomaru-Filho M. Physicochemical analysis of MTA and Portland cement associated with four different radiopacifiers. *Rev. odontol. UNESP*. 2014; 43 (4): 228-235.
21. Costa, EMMB *et al*. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *J Bras Patol Med Lab*. 2010 Jun; 46(3): 175-180.
22. Curtis PM Jr, von Fraunhofer JA, Farman AG. The radiographic density of composite restorative resins. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990 Aug; 70 (2): 226-230.
23. da Silva BM, Tomazinho FSF, Anele JA, Leonardi DP, Filho FB. A ação do hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical secundária. *Odonto (São Bernardo do Campo)* 2010 Jul-Dez; 18(36):95-105.

24. da Silva SR, da Silva Neto JD, Veiga DF, Schnaider TB, Ferreira LM. Portland cement versus MTA as a root-end filling material. A pilot study. *Acta Cir Bras*. 2015 Feb; 30(2): 160-4.
25. da Silva SYAA, Silva LE, Kaly MTAC, Leal B, Correa LC, Santos D et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do MTA e cimento Portland em cepas de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Flum Odontol*. 2011 Jul-Dez; 17 (36): 47-52.
26. de Carvalho PM Jr, Rodrigues RF, Sawaya AC, Marques MO, Shimizu MT. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. *J Ethnopharmacol*. 2004 Dec; 95 (2-3): 297-301.
27. Ergücü Z, Türkün LS, Onem E, Güneri P. Comparative radiopacity of six flowable resin composites. *Oper Dent*. 2010 Jul-Aug; 35 (4): 436-440.
28. Gonçalves JL, Viapiana R, Miranada CES, Borges AH, Cruz Filho AM. Evaluation of physico-chemical properties of Portland cements and MTA. *Braz Oral Res*. 2010 Jul-Sep; 24(3): 277-83.
29. Gu S, Rasimick BJ, Deutsch AS, Musikant BL. Radiopacity of dental materials using a digital X-ray system. *Dent Mater*. 2006 Aug; 22 (8): 765-770.
30. Guerreiro-Tanomaro JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent*. 2012 Oct; Article ID 469019: 5 pages.
31. Guerreiro-Tanomaro JM, Storto I, Da Silva GF, Bosso R, Costa BC, Bernardi MI, et al. Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J*. 2014 Apr; 33 (4): 460-70.
32. Hasan Zarrabi M, Javidi M, Naderinasab M, Gharechari M. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. *J Oral Sci*. 2009; 51 (3): 437-42.
33. Hwang YC et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol J. Endod*. 2009; 107 (3): 96-102.

34. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco-Júnior IM, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JÁ et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2001; 12 (1): 3-8.
35. Hungaro Duarte MA et al. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35 (5): 737-40.
36. Hungaro Duarte MA et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012; 38 (3): 394-7.
37. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod*. 2006 Mar; 32(3): 193-7.
38. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. p. 551-578.
39. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105 (1): 54-7.
40. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics* 1993 Nov; 19 (11): 541-4.
41. Leites AC, Figueiredo JAP, Demarco FF, Bosso AP, Piva E. Radiopacity of the modified Portland cement in comparison with MTA. *Rev. odonto ciênc*. 2008; 23 (2): 145-149.
42. Lima CAA, Pastore GM, Lima EDPA. Estudo da atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-anão precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da cavidade bucal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2000; 20: 358-362.
43. Mangala MG, Sharath Chandra SM, Bhayle RM. To evaluate the biocompatibility of the Indian Portland cement with for potential use in dentistry: An animal study. *Journal of Conservative Dentistry* 2015; 18(7): 440-4.
44. Martínez-Lalis R, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2009; 20 (2): 112-7.

45. Mazurek C, Sassone LM, Andrade AO, Murad CF, Fidel RAS, Hirata-Júnior R. Atividade antimicrobiana de materiais reparadores de uso endodôntico pelos testes de difusão em ágar e por contato direto. *Rev. bras. odontol.* 2012 Jan-Jun; 69 (1): 25-9.
46. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2014 Nov-Dec; 22(6): 554-9.
47. Miyagak CD, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res.* 2006; 20 (4): 303-6.
48. Nacif MCAM, Alves FRF. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. *Rev. Bras. Odontol.* 2010 Jul-Dez; 67 (2): 209-14.
49. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard. 8.ed. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6), Wayne, Pennsylvania. 2003a. www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp.
50. New American Dental Association specification N° 27 for direct filling resins. Council on Dental Materials and Devices. *J Am Dent Assoc.* 1977 Jun; 94 (6): 1191-4.
51. New American Dental Association. The desirability of using radiopaque plastics in dentistry: a status report. Council on Dental Materials, Instruments and Equipment. *J Am Dent Assoc.* 1981 Mar; 102(3): 347-9.
52. Oliveira ACM, Duque C. Atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos. *Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo* 2013 Jan-Abr; 25 (1): 58-67.
53. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18 (1): 3-7.
54. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobuti NR, Sinto SI. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica.* São Paulo: Sarvier; 2000.
55. Ostrosky EA, Myzumoto MK, Lima MEL, Kaneco TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008 Abr-Jun; 18 (2): 301-7.

56. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. Revista de Odontologia da UNESP. 2007; 36(2): 163-68.
57. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review - Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. J Endod. 2010 Mar; 36 (3): 400-13.
58. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003 Jan; 36(1):1-11.
59. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2003. p. 325.
60. Rocha EALSS, de Carvalho AVOR, de Andrade SRA, de Medeiros ACD, Trovão DMBM, Costa EMMB. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2013; 34 (3): 351-5.
61. Saliba E, Baixa-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. J Endod. 2009; 42(4): 322-8.
62. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. Int. Endod. J. 2005; 38 (8): 539-43.
63. Souza LC, Yadlapati M, Dorn SO, Silva R, Letra A. Analysis of radiopacity, pH and cytotoxicity of a new bioceramic material. J Appl Oral Sci 2015 Jul-Aug; 23(4):383-9.
64. Takeshita WM, Santos LRA, Castilho JCM, Medici Filho E, Moraes LC, Sannomiya EK. An investigation of the density of composite resin using digital radiography. Braz Dent Sci. 2004; 7 (2): 6-11.
65. Takeshita WM, Bissoli CF, Santos LRA, Castilho JCM, Medici Filho E, de Moraes MEL. Calcium hydroxide cavityliners: a study of the optical density using a digital system. Rev Odont Ciênc. 2008; 23(1): 63-66.

66. Takeshita WM, Vessoni Iwaki LC, Da Silva MC, Filho LI, Queiroz Ade F, Geron LB. Comparison of the diagnostic accuracy of direct digital radiography system, filtered images, and subtraction radiography. *Contemp Clin Dent*. 2013 Jul; 4 (3): 338-342.
67. Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cement and Portland cement. *J Oral Sci* 2007; 49 (1): 41-5.
68. Tanomaru-Filho M, Garcia AC, Bosso-Martelo R, Berbert FL, Nunes Reis JM, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of addition of calcium oxide on physicochemical properties of Portland cement with zirconium or niobium oxide. *J Conserv Dent*. 2015 Mar-Apr; 18(2): 105-8.
69. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1999 Mar; 25 (3): 197-205.
70. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review - Part II: Leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010 Feb; 36 (2): 190-202.
71. Valera MC, Camargo CH, Carvalho AS, Gama ER. In vitro evaluation of apical microleakage using different root-end filling materials. *J Appl Oral Sci*. 2006 Jan; 14 (1): 49-52.
72. Vivan RR et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108 (6): 35-8.
73. Vivan RR et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110 (2): 250-6.

ANEXO A

Normas da Revista Dental Materials

Official Publication of the Academy of Dental Materials

DESCRIPTION

Online submission and editorial system now available at <http://ees.elsevier.com/dema>

Dental Materials publishes original research, review articles, and short communications.

Academy of Dental Materials members click here to register for free access to Dental Materials online.

The principal aim of Dental Materials is to promote rapid communication of scientific information between academia, industry, and the dental practitioner. Original Manuscripts on clinical and laboratory research of basic and applied character which focus on the **properties** or **performance** of **dental materials** or the **reaction** of host tissues to materials are given priority publication. Other acceptable topics include application technology in **clinical dentistry** and dental laboratory technology.

Comprehensive reviews and editorial commentaries on pertinent subjects will be considered.

AUDIENCE

Dental research scientists, materials scientists, clinicians, students of dentistry, dental materials and equipment manufacturers.

IMPACT FACTOR

2014: 3.769 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

David C. Watts PhD FADM, University of Manchester School of Dentistry, Manchester, UK.

Editorial Advisor

Nick Silikas PhD FADM, University of Manchester School of Dentistry, Manchester, UK.

Editorial Assistant

Diana Knight, University of Manchester School of Dentistry, Manchester, UK.

GUIDE FOR AUTORS

Authors are requested to submit their original manuscript and figures via the online submission and editorial system for Dental Materials. Using this online system, authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process. Please register at: <http://ees.elsevier.com/dema>.

Dental Materials now only accepts online submissions.

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

Manuscripts

The journal is principally for publication of **Original Research Reports**, which should preferably investigate a defined hypothesis. Maximum length 6 journal pages (approximately 20 double-spaced typescript pages) including illustrations and tables.

Systematic Reviews will however be considered. Intending authors should communicate with the Editor beforehand, by email, outlining the proposed scope of the review. Maximum length

10 journal pages (approximately 33 double-spaced typescript pages) including figures and tables.

Three copies of the manuscript should be submitted: each accompanied by a set of illustrations. The requirements for submission are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", *Annals of Internal Medicine*, 1997,126, 36-47. All manuscripts must be written in American English. Authors are urged to write as concisely as possible.

The Editor and Publisher reserve the right to make minimal literary corrections for the sake of clarity. Authors for whom English is not the first language should have their manuscripts read by colleagues fluent in English. If extensive English corrections are needed, authors may be charged for the cost of editing. For additional reference, consult issues of *Dental Materials* published after January 1999 or the Council of Biology Editors Style Manual (1995 ed.).

All manuscripts should be accompanied by a **letter of transmittal**, signed by each author, and stating that the manuscript is not concurrently under consideration for publication in another journal, that all of the named authors were involved in the work leading to the publication of the paper, and that all the named authors have read the paper before it is submitted for publication.

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety.

Manuscripts not conforming to the journal style will be returned. In addition, manuscripts which are not written in fluent English will be rejected automatically without refereeing.

For further guidance on electronic submission, please contact Author Services, Log-In Department, Elsevier Ltd, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK. E-mail: authors@elsevier.co.uk, fax: +44 (0)1865 843905, tel: +44 (0)1865 843900.

Page charges

This journal has no page charges.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journalauthors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical

Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a

Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop

(<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the *Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals*, <https://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammarcheck' functions of your word processor.

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information

(http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/c/10528/supporthub/publishing).

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

This must be presented in a structured format, covering the following subjects, although actual subheadings should not be included:

- succinct statements of the issue in question;
- the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue (reference);
- the aims and objectives of the research being reported relating the research to dentistry, where not obvious.

Materials and methods

- describe the procedures and analytical techniques.
- only cite references to published methods.
- include at least general composition details and batch numbers for all materials. □
identify names and sources of all commercial products e.g

"The composite (Silar, 3M Co., St. Paul, MN, USA)..."

"... an Au-Pd alloy (Estheticor Opal, Cendres et Metaux, Switzerland)."

- specify statistical significance test methods.

Results

- refer to appropriate tables and figures.
- refrain from subjective comments.
- make no reference to previous literature.
- report statistical findings.

Discussion

- explain and interpret data.
- state implications of the results, relate to composition.
- indicate limitations of findings.
- relate to other relevant research.

Conclusion (if included)

- must NOT repeat Results or Discussion
- must concisely state inference, significance, or consequences

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract (structured format)

- 250 words or less.
- subheadings should appear in the text of the abstract as follows: Objectives, Methods, Results, Significance. (For Systematic Reviews: Objectives, Data, Sources, Study

selection, Conclusions). The Results section may incorporate small tabulations of data, normally 3 rows maximum.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of

96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Up to 10 keywords should be supplied e.g. dental material, composite resin, adhesion.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information

(http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Embed the used fonts if the application provides that option.
 - Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
 - Number the illustrations according to their sequence in the text.
 - Use a logical naming convention for your artwork files.
 - Provide captions to illustrations separately.
 - Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
 - Submit each illustration as a separate file.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Captions to tables and figures

- list together on a separate page.
- should be complete and understandable apart from the text.
- include key for symbols or abbreviations used in Figures.
- individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

References

Must now be given **according to the following numeric system**:

Cite references in text in numerical order. Use square brackets: in-line, not superscript e.g. [23]. All references must be listed at the end of the paper, double-spaced, without indents. For example: 1. Moulin P, Picard B and Degrange M. Water resistance of resin-bonded joints with time related to alloy surface treatments. J Dent, 1999; 27:79-87. 2. Taylor DF, Bayne SC, Sturdevant JR and Wilder AD. Comparison of direct and indirect methods for analyzing wear of posterior composite restorations. Dent Mater, 1989; 5:157-160. Avoid referencing abstracts if possible. If unavoidable, reference as follows: 3. Demarest VA and Greener EH .Storage

moduli and interaction parameters of experimental dental composites. J Dent Res, 1996; 67:221, Abstr. No. 868.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/dental-materials>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

- [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website:
- [4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data.

For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Audio Slides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources
(including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you

can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).



Author Inquiries

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.